

PRRS 病毒 E 基因的克隆及表达载体的构建

苑博华, 蒋继志, 刘红梅

(河北大学 生命科学学院, 河北 保定 071002)

摘要: 分别以质粒 pBV221 和 pPIC9K 为表达载体, 成功构建了 PRRS 病毒 E 基因克隆载体, 转化后经抗性筛选、PCR 扩增、双酶切鉴定, 确认得到了含有目的基因的阳性克隆。对含有 E 蛋白原核表达载体的阳性克隆进行诱导表达, 经过酶联免疫鉴定, 结果显示外源蛋白在宿主菌中有表达, 成功实现了在大肠杆菌细胞中的克隆。本研究成功构建了 PRRSV BJ4 毒株 E 基因的原核表达载体和真核表达载体, 为基因工程疫苗的研制奠定了基础。

关键词: PRRSV; 基因克隆; 原核表达; 真核表达

中图分类号: Q342 文献标识码: A 文章编号: 1000-7091(2006)01-0027-04

Cloning of E Gene of PRRS Virus and Construction of Its Expressing Vectors

YUAN Bo hua, JIANG Ji zhi, LIU Hong mei

(College of Life Sciences, Hebei University, Baoding 071002, China)

Abstract: The E gene fragments of PRRS strain BJ4 have been amplified and cloned into plasmid pBV221 and pPIC9K. Recombinant plasmid was constructed and transformed into the JM109. The result indicated that the recombinant vectors were successfully constructed. Positive clones of target genes were screened by PCR and identified with restriction endonuclease analysis. The positive clone of recombinant prokaryotic expression vector was induced and expressed with ELISA showed that it could react with the antibody to PRRSV. The results showed that E Protein of PRRSV was expressed in prokaryote system. The prokaryotic expression vector and eucaryotic expression vector were successfully constructed, which would be useful for production of gene vaccination in future.

Key words: PRRSV; Gene cloning; Prokaryotic expression; Eucaryotic expression

猪繁殖与呼吸综合症(Porcine reproductive and respiratory syndrome, PRRS)是一种新发现的传染病,其病原是猪繁殖与呼吸综合症病毒(Porcine reproductive and respiratory syndrome virus, PRRSV),主要表现为妊娠母猪早期流产、死胎、木乃伊胎及产弱仔等繁殖障碍以及各年龄猪发生呼吸道症状、仔猪死亡率高、感染猪出现免疫抑制等现象^[1~3]。此病给世界养猪业每年造成的损失达几十亿美元,间接损失更加难以计算。我国于1996年首次分离到PRRSV,但最近几年,该病在我国的发病率呈明显上升趋势,已成为我国发展养猪业生产的限制因素^[4~6]。PRRSV系单股正链RNA病毒,为最近成立的动脉炎病毒科Arteriviridae成员^[7],基因组全长约15 kb,包括

8个开放阅读框架(ORFs)^[8]。由于目前用来防治PRRSV的灭活疫苗和弱毒疫苗均存在着不同程度的缺陷,再加上抗原变异和动物个体差异,常规疫苗的局限性愈来愈明显,所以利用生物技术手段开发新型疫苗以取代现用的常规疫苗已经势在必行。PRRSV的ORF5基因编码的糖基化的囊膜蛋白(E蛋白)具有较好的免疫原性,能够诱导产生中和抗体,且中和抗体出现之后,抗血清主要识别E蛋白。此外,E蛋白还具有诱导细胞凋亡^[9]、参与病毒粒子结合病毒受体的过程^[10]等作用。因此,E蛋白在PRRSV的致病性、诊断、预防与控制等方面具有重要意义,是研制基因工程疫苗的最有力的候选基因。本研究拟构建E基因原核和真核表达载体,制成工

收稿日期:2005-11-12

基金项目:河北省自然科学基金项目(300081);河北省省级重点学科生物工程

作者简介:苑博华(1980-),女,河北邯郸人,在读硕士,主要从事植物生物化学与分子生物学方面的研究工作;蒋继志为通讯作者。

程菌,为基因工程疫苗的研制奠定基础。

1 材料和方法

1.1 毒株、质粒和细胞

PRRSV 北京地区 BJ-4 分离株和 HS-2H 细胞由中国农业大学惠赠。pBV221 质粒和 pPIC9K 质粒,由河北大学赵晓瑜研究员惠赠。大肠杆菌 JM109 菌株为本实验室保存。

1.2 工具酶与试剂

Trizol Regent 购自 Gibco 公司。限制性内切酶 *EcoR* I、*Not* I、*Bam*H I Taq DNA 聚合酶、RT-PCR 试剂盒、DNA 快速连接试剂盒购自宝生物工程(大连)有限公司(TaKaRa DNA Ligation Kit Ver. 2)。

1.3 引物

根据 GenBank 上发表的 PRRSV BJ-4 株 E 蛋白的基因序列及所要插入的质粒 pBV 221 和 pPIC9K 的限制性内切酶图谱设计 PCR 引物。在 PE I (构建原核表达载体)上游引物的 5' 端添加 *EcoR* I 酶切位点及保护性碱基 g,在下游引物的 5' 端添加 *Bam*H I 酶切位点及保护性碱基 cg;

上游引物: 5'-GGAATTCAAATGTTGGAGAAATGCIT-3'
(*EcoR*I位点)

下游引物: 5'-CGGATCCCTAAGGACGACCCCATTTG-3'
(*Bam*H I位点)

基因引物 PE II (构建真核表达载体): 在上游引物的 5' 端添加 *EcoR* I 酶切位点及保护性碱基 cg,在下游引物的 5' 端添加 *Not* I 酶切位点及保护性碱基 ataagaat。

上游引物: 5'-CGGAATCTTGGAGAAATGCITGACCG-3'
(*EcoR*I位点)

下游引物: 5'-ATAAGAAAT GCGGCCGCCCTAAGGACGAC-CCCATTTG-3' (*Not*I位点)

1.4 ORF5 cDNA 序列的克隆

将 PRRSV BJ-4 株接种于 HS-2H 细胞,细胞病变达到 50%~70% 时收获病毒。参照文献[11]进行总 RNA 的抽提。按 TRIZOL IS Regent 说明,用异硫氰酸胍-酚氯仿一步法提取病毒基因组 RNA。利用各对引物对 PRRSV 的 cDNA 进行 PCR 扩增,对其产物进行 1.5% 琼脂糖电泳。将 pBV221 以及 PE I 和 PE II 扩增的 E 基因片段分别进行 *EcoR* I 和 *Bam*H I、*Not* I 和 *EcoR* I 的双酶切。采用 DNA 连接试剂盒对酶切产物进行连接。通过 CaCl_2 法把 pBV221 转化大肠杆菌 JM109 感受态细胞,利用氨苄青霉素

抗性对转化子进行筛选。

1.5 阳性重组子的筛选与鉴定

将转化后的菌悬液涂布到含 1.6% 琼脂、50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 氨苄青霉素的的固体 LB 平板上培养。挑取阳性菌落提取质粒。分别以引物 PE I 和 PE II 对阳性重组子进行 PCR 扩增,电泳检测扩增片段。分别对阳性重组子进行 *EcoR* I 和 *Bam*H I 以及 *Not* I 和 *EcoR* I 双酶切,电泳检测扩增片段。

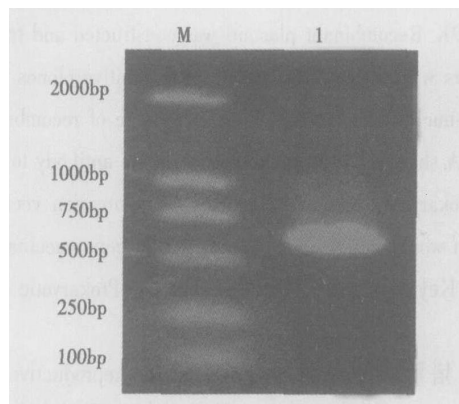
1.6 原核重组菌的诱导表达及鉴定

按照文献[12]的方法进行靶蛋白的诱导表达,收集诱导前和诱导 5~8 h 后的菌体。超声波破碎菌体,分离包含体,获得 E 蛋白作为 ELISA (酶联免疫吸附法)的抗原,进行 ELISA 检测鉴定蛋白^[11]。

2 结果与分析

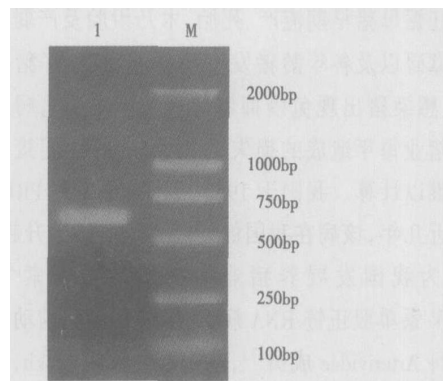
2.1 PCR 扩增基因片段

利用各对引物,对 PRRSV 的 cDNA 进行 PCR 扩增,对其产物进行 1.5% 琼脂糖电泳。分别在 600 bp 左右获得与目的片段大小相同的扩增条带(图 1,2)。



M DNA Marker DL2000; 1 RF-PCR 产物
M DNA Marker DL2000; 1 RF-PCR product
图 1 引物 PE I 的 RF PCR 扩增结果

Fig 1 The amplified product of primer PE I by RF PCR



M: DNA Marker DL2000; 1: RF-PCR 产物
M: DNA Marker DL2000; 1: RF-PCR product
图 2 引物 PE II 的 RF PCR 扩增结果

Fig 2 The amplified product of primer PE II by RF PCR

2.2 重组质粒的 PCR 鉴定

2.2.1 重组质粒 pBV221-E 的 PCR 鉴定 如图 3 所示 1 为重组质粒的 PCR 扩增产物, 2 为 RT-PCR 产物, 两个产物的泳动率相同。说明从转化子中提取的质粒为模板进行 PCR 扩增可以得到正确大小的条带, 可以初步认为 E 蛋白基因已经插入到了 pBV221 质粒中。

2.2.2 重组质粒 pPIC9K-E 的 PCR 鉴定 如图 4 所示 1 为重组质粒的 PCR 扩增产物, 2 为 RT-PCR 产物, 两个产物的泳动率相同。说明从转化子中提取的质粒为模板进行 PCR 扩增可以得到正确大小的条带, 可以初步认为 E 蛋白基因已经插入到了 pPIC9K 质粒中。

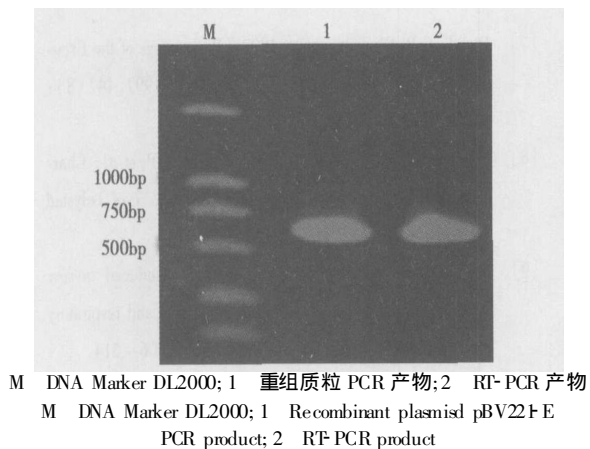


图 3 重组质粒 pBV221-E 的 PCR 鉴定
Fig 3 Identification of plasmids pBV221-E by PCR

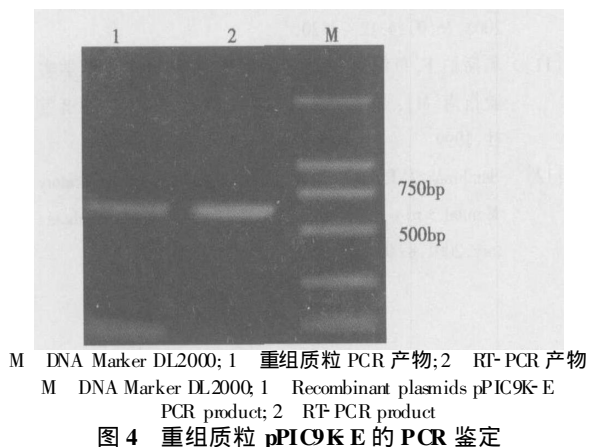
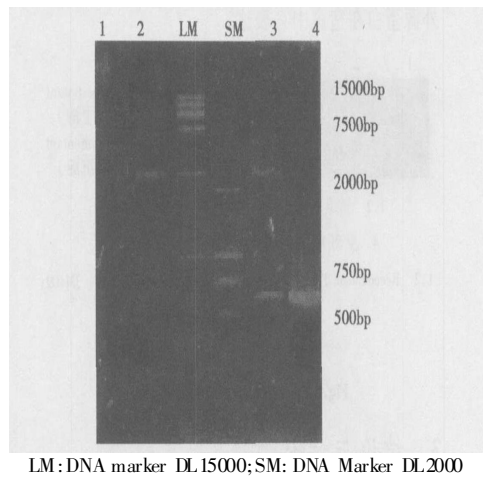


图 4 重组质粒 pPIC9K-E 的 PCR 鉴定
Fig 4 Identification of plasmids pPIC9K-E by PCR

2.3 重组质粒的酶切鉴定

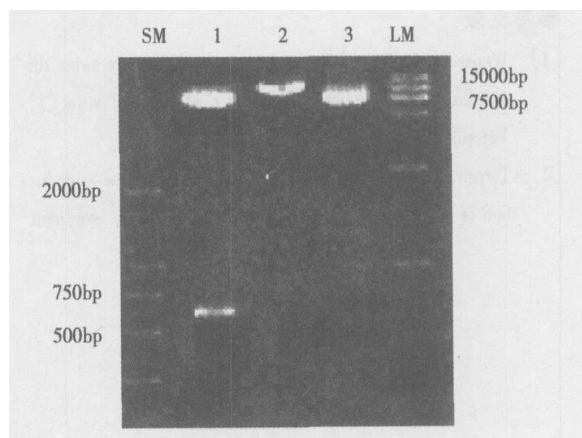
2.3.1 重组质粒 pBV221-E 的酶切鉴定 用 *Bam*H I 和 *Eco*R I 限制性内切酶对重组质粒进行酶切线性化。结果重组质粒 pBV221-E 与对照空载质粒 pBV221 经 *Eco*R I 酶切后分别得到一个线性片段 (图 5), 其中 pBV221-PRRSV-E 比 pBV221 的迁移率小一些, 这是因为前者因连入外源基因而使片段的

分子量增大的缘故。经 *Bam*H I 酶切后, 结果显示, 得到一条与目的基因分子量大小一致的 DNA 片段, 可证实, 重组质粒中携带有 PRRSV-E 片段。通过以上鉴定可以确定该重组质粒是目的阳性重组子。



LM: DNA marker DL15000; SM: DNA Marker DL2000
1 *Eco*R I 酶切质粒 pBV221; 2 *Eco*R I 酶切重组质粒 (含 CCC 型质粒)
3 *Eco*R I、*Bam*H I 双酶切重组质粒 (含 CCC 型质粒); 4 RT-PCR 产物
1 Plasmids digested by *Eco*R I; 2 Plasmids pBV221-E digested by *Eco*R I; 3 Plasmids pBV221-PRRSV-E digested by *Eco*R I and *Bam*H I; 4 RT-PCR product
图 5 质粒 pBV221 和 pBV221-E 的酶切分析
Fig 5 Identification of plasmids pBV221 and pBV221-E digested by restriction endonucleases

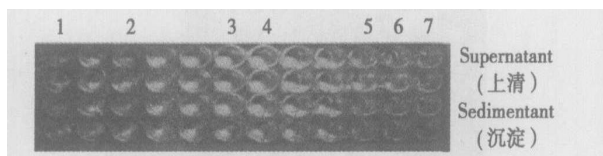
2.3.2 重组质粒 pPIC9K-PRRSV-E 的酶切鉴定 从图 6 可以看出, 重组质粒的泳动率比空载质粒的泳动率低, 重组质粒的分子量稍大于 pPIC9K。将重组质粒双酶切后跑电泳, 可以切下正确大小的条带 (600 bp 左右)。通过以上确定该重组质粒是目的阳性重组子。



LM: DNA marker DL15000; SM: DNA Marker DL2000;
1 *Eco*R I、*Not*I 双酶切重组质粒 pPIC9K-E; 2 重组质粒 pPIC9K-E; 3 质粒 pPIC9K
1 Plasmids pPIC9K-E digested by *Eco*R I and *Not* I; 2 Plasmids pPIC9K-E; 3 Plasmids pPIC9K
图 6 重组质粒 pPIC9K-E 的酶切鉴定
Fig 6 Identification of plasmids pPIC9K-E digested by restriction endonucleases

2.4 ELISA 分析结果

将洗涤后的得到的上清和沉淀利用 ELISA 分析, 结果如图 7 所示, 重组菌 E₁, E₂ 结果显示阳性, pBV221 显示阴性, 空白对照显示阴性。由此可知, 外源蛋白在宿主中有表达。



1, 2 重组菌株 E₁; 3 含有质粒 pBV221 的 JM109;

4 空菌 JM109; 5, 6 重组菌株 E₂; 7 空白对照

1, 2 Recombinant E₂; 3 JM109 consist of plasmid pBV221; 4 JM109;

5, 6 Recombinant E₂; 7 Blank

图 7 ELISA 反应结果

Fig. 7 Result via ELISA Reaction

3 结论与讨论

在本试验中, 选用质粒 pBV 221 和 pPIC9K 分别作为表达载体, 与 E 基因成功构建了克隆载体, 利用 CaCl₂ 法转化大肠杆菌 JM109, 经抗性筛选、PCR 扩增、双酶切鉴定, 确认得到了含有目的基因的阳性克隆。

对含有 E 蛋白原核表达载体的阳性克隆进行诱导表达, 应用酶联免疫实验, 表达蛋白与阳性血清的免疫反应, 获得的重组蛋白具有被特异性抗体识别的抗原活性。E 蛋白基因表达产物的最佳诱导条件还需深入研究, 表达量有待于进一步提高。

参考文献

- [1] Wensvoot G, Tepstra C, Pol J M A, *et al.* Mystery swine disease in the Netherlands: the isolation of Lelystad virus [J]. *Veterinary Quarterly*, 1991, 13: 121–130.
- [2] Terpstra C, Wensvoot G, Pol J M A. Experimental reproduction of porcine epidemic abortion and respiratory syndrome

(mystery swine disease) by infection with Lelystad virus [J]. *Vet Q*, 1991, 13: 131–136.

- [3] Mengeling W L, Lager K M, Vorwald A C. Clinical effects of porcine reproductive and respiratory syndrome virus on pigs during the early postnatal interval [J]. *Am J Vet Res*, 1998, 59 (1): 52–55.
- [4] 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.
- [5] 乔传玲, 郑厚旌, 甘孟侯, 等. 反转录聚合酶反应检测猪繁殖与呼吸综合征病毒的研究 [J]. *畜牧兽医学报*, 2000, 31(3): 262–266.
- [6] 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鉴定 [J]. *中国兽医杂志*, 1997, 23(11): 3–5.
- [7] Pringle C R. Virus Taxonomy 1997– Proceedings of the Executive Committee of the ICTV [J]. *Arch Virol*, 1997, 142(8): 1727–1733.
- [8] Meulenbergh J J M, Besten A P, de Kluyver E P, *et al.* Characterization of proteins encoded by ORFs 2 to 7 of Lelystad virus [J]. *Virology*, 1995, 206: 155–163.
- [9] Sur J H, Doster A R, Osorio F A. Apoptosis induced *in vivo* during acute infection by porcine reproductive and respiratory syndrome virus [J]. *Vet Pathol*, 1998, 35(6): 506–514.
- [10] Delputte P L, Vanderheijden N, Nauwynck H J, *et al.* Involvement of the matrix protein in attachment of porcine reproductive and respiratory syndrome virus to a heparinlike receptor on porcine alveolar macrophages [J]. *J Virol*, 2002, 76(9): 4312–4320.
- [11] 奥斯特伯 F, 布伦特 R, 金斯敦 R E. 精编分子生物学实验指南 [M]. 颜子颖等, 译 (第 3 版). 北京: 科学出版社, 1999.
- [12] Sambrook J, Russell D W. Molecular cloning: A Laboratory Manual 3rd ed [M]. New York: Cold Spring Harbor Laboratory, 2001. 8: 40–55.