

# 猪繁殖与呼吸综合征病毒 Hn-1/06 株 GP3 蛋白的原核表达与纯化

王中明,李素平,夏平安,尹彦涛,李伟娟,邱 璜,刘明莉,刘玉松,崔保安

(河南农业大学 牧医工程学院,河南 郑州 450002)

**摘要:**根据 GenBank 中 PRRSV 美洲株 ATCC VR2332 的 *ORF3* 基因序列,利用 Primer 5.0 软件设计合成了 1 对特异性引物,经 RT-PCR 从河南分离株 Hn-1/06 株扩增得到了大小为 765 bp 的片段,并将扩增的片段插入 pTG19-T 载体进行测序而获得含有 *ORF3* 的阳性克隆 pTG19-T GP3。将此基因亚克隆到原核表达载体 pET-32a,经筛选获得了阳性重组质粒 pET-GP3,进而在 IPTG 的诱导下成功表达,获得了大小约为 45 kDa 的融合蛋白 GP3-His,纯化后经 Western blot 检测证实表达的融合蛋白具有良好的生物学活性。从而为进一步研究 PRRSV 次要结构蛋白 GP3 的免疫特性和功能奠定了基础。

**关键词:**PRRSV;GP3 蛋白;原核表达

**中图分类号:**Q786 **文献标识码:**A **文章编号:**1000-7091(2009)01-0103-05

## Prokaryotic Expression of GP3 Protein of Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus Hn-1/06 Strain

WANG Zhong-ming, LI Su-ping, XIA Ping-an, YIN Yan-tao, LI Wei-juan,

QIU Huang, LIU Ming-li, LIU Yu-song, CUI Bao-an

(College of Animal Husbandry and Veterinary, Henan Agricultural University, Zhengzhou 450002, China)

**Abstract:** One pair of specific primers was designed according to the sequence of PRRSV *ORF3* gene published in GenBank (Accession number PRU87392), and was used to amplify the *ORF3* gene from a PRRSV Hn-1/06 strain by RT-PCR method, resulting in a 765 bp gene fragment. The RT-PCR product was directly cloned into the pTG19-T vector and the recombinant plasmid was identified by enzyme digesting and DNA sequencing. The positive clone was designated as pTG19-T GP3. After being cloned into the prokaryotic expression vector pET-32a, the *ORF3* gene was successfully obtained by the induction of IPTG. Western blot test confirmed that the expressed fusion protein could specifically react with the antiserum against PRRSV. It could be used for the further investigation on immunogenicity and function of GP3 of PRRSV.

**Key words:** PRRSV; GP3; Prokaryotic expression

猪繁殖与呼吸综合征病毒(Porcine reproductive and respiratory syndrome virus, PRRSV)属于动脉炎病毒科动脉炎病毒属,是目前引起猪场繁殖障碍的主要病原之一,临床上可引起母猪发热、厌食、早产、流产、木乃伊胎、死胎和产弱仔等繁殖障碍及各种年龄猪的呼吸困难和仔猪的高死亡率<sup>[1]</sup>,给世界和我国养猪业造成了巨大的经济损失。PRRSV GP3 由 *ORF3* 基因编码,是一种糖基化蛋白,在病毒的致病性、复制、装配、变异和保护性反应等方面具有重要

意义<sup>[2,3]</sup>。Plana 等<sup>[4]</sup>报道,用西班牙 Olot/91 株 *ORF3* 的杆状病毒表达产物接种怀孕母猪,保护率达到 68.8%,表明 GP3 具有抗原性,并可诱导细胞免疫。国内外的大量研究也表明,PRRSV 的具有较强的免疫原性,尤其在细胞免疫方面更具有优势<sup>[5]</sup>。为了更深入探讨 GP3 蛋白的特性,本研究采用原核高效表达载体 pET-32a 在 *E. coli* BL21 细胞中表达了 PRRSV 的 GP3 蛋白,为进一步研究其免疫特性、结构与功能奠定了基础。

收稿日期:2008-11-25

作者简介:王中明(1984-),男,河南焦作人,硕士,主要从事动物疫病分子病原学及分子免疫学研究。

通讯作者:夏平安(1964-),男,湖北鄂州人,副教授,主要从事动物分子病毒学研究。

## 1 材料和方法

### 1.1 病毒及血清

PRRSV Hnr-1/06 株由河南农业大学兽医微生物研究室在 Marc-145 细胞上培养分离并保存。猪抗 PRRSV 阳性血清由本实验室制备并保存。

### 1.2 质粒载体与菌株

pTGI9-T 载体购自上海捷瑞生物工程有限公司;原核表达载体 pET-32a、大肠杆菌 DH5、BL21 均由河南农业大学兽医微生物研究室保存。

### 1.3 试剂和工具酶

TRIzol<sup>®</sup>LS Reagent 购自 Invitrogen 公司、RT 试剂盒购自 Promega 公司;T4 DNA 连接酶、*rTaq* 酶、限制性内切酶 *Bam*H I、*Hind* III、DNA Marker DL2000 及 DL15000 和蛋白质分子量标准(低)等购自大连宝生物工程有限公司;IPTG、尿素、DAB 显色试剂盒及 DNA 胶回收纯化试剂盒购自上海生物工程技术服务有限公司;HRP 标记的羊抗猪 IgG 为 SBA 公司产品。

### 1.4 引物设计

根据美洲株 ATCC VR-2332 已发表序列(GenBank Accession No. PRU87392)设计了 1 对针对 *ORF3* 的特异性引物,该对引物扩增序列 765 bp。引物由上海捷瑞生物工程有限公司合成。

上游引物 P31:5'-ATGGCTAATAGCTGTACA TTCCTCC-3

下游引物 P32:5'-CTATCGCCGTCCGGCACT-3

### 1.5 PRRSV RNA 的提取

取 PRRSV 细胞毒 250  $\mu$ L,加入 750  $\mu$ L 的 Trizol 裂解液,振摇混匀,室温放置 10 min 加入氯仿 200  $\mu$ L,室温放置 10 min,12 000 r/min 离心 10 min,取上清液,加入等体积的异丙醇,室温放置 10 min,以 12 000 r/min 离心 10 min,弃上清,沉淀用 75%乙醇洗涤,用滤纸吸干剩余的液体,加入 20  $\mu$ L 焦碳酸二乙脂(DEPC)灭菌水溶解,-80℃保存备用。

### 1.6 RT-PCR 扩增 *ORF3*

按照 RT 试剂盒使用说明进行反转录。反转录结束后进行 PCR 扩增,体系为:*rTaq* 酶 2.5  $\mu$ L;dNTP 10 mmol;上、下游引物各 20 pmol;cDNA 5  $\mu$ L;10  $\times$  Buffer 5  $\mu$ L;灭菌双蒸水补足 50  $\mu$ L。PCR 反应参数为:94℃预变性 5 min,PCR 循环为 94℃变性 45 s,56.8℃退火 1 min,72℃延伸 1 min,35 个循环后,72℃延伸 10 min。全部反应结束后,取 5  $\mu$ L PCR 产物进行 1.0%琼脂糖凝胶电泳检查。

### 1.7 目的基因的克隆与鉴定

按上海生工 UNIQ-10 柱式 DNA 胶回收试剂盒

说明书纯化回收 PCR 产物,并将胶回收产物连接于 pTGI9-T 载体中,连接产物按常规方法转化 DH5 感受态细胞,进行蓝白斑筛选,挑选白斑接于含有氨苄青霉素的 LB 培养基 37℃过夜培养。取培养物提取质粒,进行酶切和 PCR 鉴定,筛选出阳性重组质粒 pTGI9-T-GP3,送北京博尚生物技术有限公司测序。

### 1.8 引物设计

通过分析 PRRSV Hnr-1/06 株的 *ORF3* 基因序列和 *ORF3* 基因编码的氨基酸序列,设计 1 对引物 P3S 和 P3A。此对引物可扩增去掉起始密码子和终止密码子及缺失 N-末端疏水序列的 *ORF3* 基因 dORF3。为了便于操作,引物 P3S 和 P3A 5'端分别设计了 *Bam*H 和 *Hind* III 酶切位点,预期目的基因长度为 692 bp。上述引物由上海捷瑞生物公司合成,引物序列为:

上游引物 P3S:5'-aataggatccacgttctgtttttggttcgcgtg-3

下游引物 P3A:5'-tataaagcttgcgcgtgcgcactgag-3

按上海生工 UNIQ-10 柱式 DNA 胶回收试剂盒说明书纯化回收 PCR 产物,并将胶回收产物用 *Bam*H 和 *Hind* III 双酶切过夜,回收酶切目的片段,将回收的目的片段与经 *Bam*H 和 *Hind* III 消化后的 pET-32a 于 16℃连接过夜<sup>[6]</sup>,按常规方法转化大肠杆菌 DH5,碱裂解法小量提取质粒,用 *Bam*H 和 *Hind* III 进行酶切鉴定,1%琼脂糖凝胶电泳检查是否插入大小正确的目的片段,并对阳性重组表达质粒 pET-GP3 进行序列测定,以确证其读码框是否正确。

### 1.9 融合蛋白在大肠杆菌中的表达

将重组质粒 pET-GP3 转化大肠杆菌 BL21 感受态细胞,在转化的平皿中挑取单菌落,37℃振荡培养 16 h,将培养物以 1:100 的稀释度接种于含终浓度为 100  $\mu$ g/mL 氨苄青霉素的新鲜 LB 液体培养基中,于 37℃振荡培养至 OD<sub>600</sub>达到 0.5~1.0 时,加入终浓度为 1.0 mmol/L 的 IPTG,分别于诱导前和诱导后 1、2、4、6 h 收集菌液,用 15%聚丙烯酰胺凝胶进行 SDS-PAGE 电泳观察。

### 1.10 包涵体的提取和纯化

1.10.1 包涵体的制备 按最佳诱导表达条件诱导表达基因工程重组菌 400 mL,离心收集诱导表达的菌体并称取菌体湿质量。每克湿菌沉淀加入 3 mL 50 mmol/L PBS (pH8.0) 悬浮菌体,以冻融法于 -20℃和 37℃反复冻融 10 次,加入溶菌酶(终浓度为 100  $\mu$ g/mL),混匀后冰浴 10 min,然后 4℃作用 30 min。随后在冰浴中进行超声波处理,每次超声处理 2 s,间隔 9 s,共作用 200 次,加入终浓度为 10  $\mu$ g/mL

DNase ,作用至菌液不再粘稠。

1.10.2 包涵体的洗涤和纯化 按常规方法<sup>[7]</sup> ,将裂解产物 4 12 000 r/min 离心 15 min ,弃去上清 ,每克湿菌沉淀加入 1 mL 水悬浮菌体 ,每支 100 μL 装 5 支 EP 管 ,其余 4 保存。4 12 000 r/min 离心 15 min ,将每份沉淀用含不同浓度 (0.5 ,1 ,2 ,3 ,5 mol/L) 尿素的包涵体洗涤液洗涤和溶解包涵体 ,每次洗涤室温作用 5 ~ 10 min ,然后 4 下 10 000 r/min 离心 20 min ,分别收集上清和沉淀 ,用 15 %聚丙烯酰胺凝胶做 SDS-PAGE 电泳 ,分析最佳的尿素洗涤浓度。用最佳浓度将其余的包涵体沉淀洗涤纯化。

1.10.3 包涵体的复性 将溶解的上清装入已处理的透析袋内 ,置于复性缓冲液中 (1 ×PBS ,1 mmol/L EDTA ,尿素 ,pH8.0) 在 4 下进行梯度透析 ,复性缓冲液中尿素浓度依次递减 4.5 ,3.5 ,2.5 ,1.5 ,0.5 ,0 mol/L ,换液间隔时间为 10 ~ 12 h。

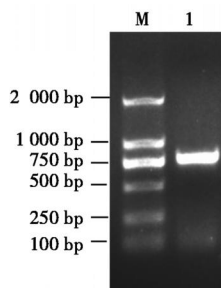
### 1.11 重组蛋白的免疫活性检测

按常规方法进行 Western blot 分析<sup>[8]</sup> ,应用 PRRS 阳性血清和 HRP 标记的羊抗猪 IgG 检测融合蛋白的免疫学活性。同时设空白载体诱导产物、重组菌未诱导产物、BL21 作对照。

## 2 结果与分析

### 2.1 目的基因的扩增

用 RT-PCR 法从 PRRSV Hrr-1/06 细胞毒中扩增出大小为 765 bp 的特异性片段 ,与预期片段大小相符 ,扩增结果见图 1。



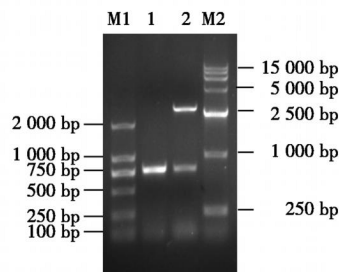
M. DL 2000 Marker ;1. ORF3 的 RT-PCR 产物。  
M. DL 2000 Marker ;1. RT-PCR product of ORF3.

图 1 PRRSV Hrr-1/06 株 ORF3 RT-PCR 扩增结果

Fig.1 Results of RT-PCR amplification

### 2.2 Hrr-1/06 PRRSV ORF3 重组质粒的 PCR 和酶切鉴定

将经纯化回收、连接、转化、筛选白斑提取的质粒作 PCR 鉴定 ,获得阳性重组质粒 pTG19-T GP3 ,并用 *Bam*H 单酶切 ,得到了与预期目标相符的大小 2 个片段 ,结果表明 :目的 DNA 片段连接、转化正确。酶切结果见图 2。



M1. DL 2000 Marker ;1. pTG19-T GP3 的 PCR 产物 ;  
2. pTG19-T GP3 的酶切产物 ;M2. DL 15000 Marker。  
M1. DL2000 Marker ;1. PCR product of pTG19-T GP3 ;  
2. pTG19-T GP3 digested with *Bam*H I ;M2. DL 15000 Marker.

图 2 pTG19-T GP3 重组质粒的酶切鉴定

Fig.2 Identification of pTG19-T GP3 with restriction endonuclease

### 2.3 目的基因的序列测定及分析

将获得的 DH5 阳性克隆菌液送上海博瑞生物公司测序 ,通过 DNA Star 和 Blust 软件分析表明 ,扩增得到的序列为 PRRSV 的 *ORF3* 基因序列。核苷酸序列长度为 765 bp ,为 *ORF3* 的完整开放阅读框 ,G + C 含量为 51.11 % ,用 BioXM2.6 软件分析表明 ,*ORF3* 基因序列共编码含 254 个成熟的氨基酸 ;具有 7 个潜在的 N-糖基化位点 (2 个 NAT ,2 个 NVS ,1 个 NYT ,1 个 NIS ,1 个 NFS) ,有 10 个与二硫键形成有关的半胱氨酸 ;分子量为 28.96 kDa ,等电点为 8.36 ;疏水氨基酸 38.97 % ,亲水氨基酸 29.92 % ,碱性氨基酸 12.99 % ,酸性氨基酸 6.29 %。结果见图 3。

### 2.4 重组质粒的鉴定

提取重组质粒 ,用特异性引物 P3S、P3A 进行 PCR 扩增 ,扩出了 1 条约 700 bp 左右的条带。进一步用 *Bam*H 和 *Hind* 双酶切重组质粒 pET-GP3 ,酶切产物经琼脂糖凝胶电泳表明酶切片段大小与预期结果完全一致 ,进而证实重组质粒构建成功。酶切结果见图 4。

### 2.5 重组蛋白的表达及纯化

将鉴定正确的重组表达质粒 pET-GP3 和空白载体质粒 pET-32a 分别转化大肠杆菌 BL21 ,在 IPTG 诱导下 ,菌体裂解物经 SDS-PAGE 检测表明 ,pET-GP3 在分子量约 45 kDa 处有特异性蛋白条带 ,与融合蛋白 (GP3-His) 预期大小基本一致 ,空白载体的菌体裂解物中在此处无特异性表达带 ,而是在 20 kDa 处出现特异性条带 ;而且重组蛋白的表达量随诱导时间的延长而增加 ,在诱导后 6 h 表达量达到高峰。通过对包涵体的提取与纯化 ,目的蛋白所占百分比可以提升到 89 %。纯化结果见图 5。

在本研究中,我们曾尝试利用原核表达载体 pET28a、pGEX-6p-1、pQE-30 构建重组原核表达质粒,在大肠杆菌中表达 PRRSV 河南分离株 Hu-1/00 *ORF3* 全长基因,并尝试各种诱导条件如利用不同培养基和诱导温度以及添加培养基添加剂等,但仅能使目的蛋白有限地表达或不表达。对河南分离株的 *ORF3* 氨基酸序列进行抗原性、亲水性、疏水性等分析后,去除了其位于 N-末端的疏水序列(1~30 aa),即预测的信号肽序列(此段序列同时也是跨膜区),利用原核表达载体 pET-32a 使 *ORF3* 基因得到了较好的表达,说明 N-末端的疏水序列对蛋白的表达有较大影响。从表达产物的 Western blot 反应结果来看,去除其疏水序列对该蛋白的反应活性并没有造成影响。

本试验中表达的融合蛋白经 SDS-PAGE 电泳分析,发现目的融合蛋白是以包涵体形式存在。本试验选择具有 His<sub>6</sub>-tag 融合表达系统,初步设想是为应用金属螯合层析法纯化蛋白奠定基础,但是在试验过程中发现,目的蛋白是以包涵体形式表达。有报道指出用含尿素的缓冲液,对包涵体分离、洗涤,初步纯化目的蛋白,可以达到后续试验中对抗原的要求<sup>[9,10]</sup>。鉴于此,本试验选择用尿素法提取并洗涤纯化包涵体。结果表明,目的蛋白得到了较好的纯化。

PRRSV 的 GP3 的编码序列是高度可变的,在不同分离株间差异较大,且氨基酸变异主要在 N-末端<sup>[11]</sup>,其氨基端的 35 个氨基酸在欧美毒株间的同源性只有 29%。另外美洲株的 GP3 在 C-末端比欧洲株少 12 个氨基酸<sup>[12]</sup>,因此二者的 C-末端性质也有差异,但这种差异是否导致功能上产生差异还不清楚。由于 GP3 蛋白在病毒粒子中的含量很低<sup>[2,13]</sup>,或并不存在于病毒粒子中<sup>[14,15]</sup>,而且在病毒粒子和病毒感染细胞中的存在形式复杂,故使得相应的研究也变得比较困难,到目前为止该蛋白在病毒粒子生命周期中的功能还不清楚。因此,还需要进一步深入研究 GP3 蛋白在 PRRSV 的致病性和免疫等方面的作用。

## 参考文献:

- [1] Hall W V. Porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) virus a significant disease of pigs[J]. Aust Vet J, 2005, 83(5):260 - 261.
- [2] Van Nieuw stad A P, Meulenberg J M, Van Essen Zandbergen A, et al. Proteins encoded by open reading frames 3 and 4 of the genome of Lelystad virus (Arteriviridae) are structural proteins of the virion [J]. J Virol, 1996, 70:4767 - 4772.
- [3] Meulenberg J M, Petersen-den Besten A, De Kluyver E P, et al. Characterization of proteins encoded by ORFs 2 to 7 of the llystad virus [J]. Virology, 1995, 206:155 - 163.
- [4] Plana duran J, Climent I, Sarraseca J, et al. Baculovirus expression of proteins of porcine reproductive and respiratory syndrome virus strain Olot/91 involvement of ORF3 and ORF5 proteins in protection[J]. Virus Genes, 1997, 14:19 - 29.
- [5] 杨金雨,仇华吉,童光志,等.猪繁殖与呼吸综合征疫苗研究进展[J].动物医学进展,2005,26(5):28 - 31.
- [6] 梁国栋.最新分子生物学实验技术[M].北京:科学出版社,2001:30 - 43.
- [7] 萨姆布鲁克 J, D. W. 拉塞尔.分子克隆实验指南[M].黄培堂等译.第 3 版.北京:科学出版社,2002:1256 - 1259.
- [8] 萨姆布鲁克 J, 弗里奇 E F, 曼尼阿蒂斯 T. 分子克隆实验指南[M].金冬雁等译.第 2 版.北京:科学出版社,1998:16 - 55, 880 - 887.
- [9] 秦睿玲,张西臣,李建华,等.柔嫩艾美球虫间接 ELISA 检测方法的建立[J].中国兽医科技,2004,34(7):60 - 63.
- [10] 胡 慧.猪瘟病毒 E2 基因主要抗原区的表达及其表达产物的间接 ELISA 诊断方法研究[D].杨凌:西北农林科技大学,2004.
- [11] Murtaugh M P, Elam M R, Kakach L T. Comparison of the structural protein coding sequences of the VR22332 and Lelystad virus strains of the PRRS virus [J]. Arch Virol, 1995, 140:1451 - 1460.
- [12] Dea S, Gagnon C A, Mardassi H, et al. Current knowledge on the structural proteins of porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) virus: comparison of the North American and European isolates[J]. Arch Virol, 2000, 145(4):659 - 688.
- [13] Meulenberg J M, Petersen-Den Besten A. Identification and characterization of a sixth structural protein of Lelystad virus: the glycoprotein GP2 encoded by ORF2 is incorporated in virus particle [J]. Virology, 1996, 225:44 - 51.
- [14] Wiczorek-Krohmer M, Weiland F, Conzelmann K, et al. Porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV): monoclonal antibodies detect common epitopes on two viral proteins of European and U. S. isolates[J]. Vet Microbiol, 1996, 51(3 - 4):257 - 266.
- [15] Mardassi H, Gönin P, Gagnon C A, et al. A subset of porcine reproductive and respiratory syndrome virus GP3 glycoprotein is released into the culture medium of cells as a non-virion associated and membrane free (soluble) form [J]. J Virol, 1998, 72:6298 - 6306.