

猪繁殖和呼吸综合征病毒膜蛋白和核衣壳
蛋白基因在大肠杆菌中的表达*蔡家利** 蔡宝祥[△] 姜平

(南京农业大学动物医学院, 南京 210095)

* (西南农业大学动物养殖学院, 重庆 400716)

Q538.42
S852.65-

摘要 以 PRRSV 弱毒株膜蛋白(M)和核衣壳(N)蛋白基因为模板,设计的一对含有 EcoRI 和 BamHI 酶切位点的引物,通过 RT-PCR 扩增出一约 900 bp 的 MN 基因片段,将此基因片段成功克隆于高效表达载体 pBV220,构建成重组质粒 pBVMN,导入大肠杆菌 DH₅ α ,经温敏诱导,成功地表达了 MN 基因。表达产物经 SDS-PAGE 电泳和 Western blot 印迹分析,其分子量约 34 kD,与兔抗 PRRSV 高免血清发生反应,经光密度扫描分析,表达产物量占菌体总蛋白的 12%。该研究为 PRRS 基因诊断抗原的研制奠定了基础。

关键词 猪繁殖和呼吸综合征病毒,质粒 pBV220,表达, M 蛋白, N 蛋白

猪繁殖和呼吸综合征(PRRS)是新发现的一种动物传染病^[1,2],其病原 PRRSV 现归为动脉炎病毒科^[3]。PRRSV 为正链单股 RNA 病毒,基因组总长为 15 kb,有 8 个开放阅读框,PRRSV 的 M 蛋白和 N 蛋白基因分别位于 ORF6 和 ORF7,有 8 bp 叠合相连,是较保守的基因序列^[4],相关的结构蛋白在诊断上有重要意义。pBV220 是一个带有双强启动子的表达载体, M 和 N 蛋白基因在 pBV220 中表达未见报道。本研究拟将 M 和 N 基因插入 pBV220,探讨 MN 基因在 pBV220 中的表达作用,为 PRRS 基因诊断抗原的研制奠定基础。

1 材料和方法

1.1 **毒株和细胞** PRRS 弱毒株,美国引进;MARC-145 细胞,南京动植物检疫局馈赠。

1.2 **载体和宿主菌** pBV220、DH₅ α 由南京农业大学生物技术发展中心保存。

1.3 **酶及化学试剂** RT-PCR 试剂盒, Promerger 公司产品;犊牛血清、EcoRI、BamHI 内切酶、Taq DNA 聚合酶、T₄DNA 连接酶、溶菌酶、HRPO-羊抗兔 IgG 结合物均为华美生物工程公司产品;DMEM 培养基,美国产;其它化学试剂均为国产分析纯或电泳级试剂。

1.4 **引物的设计与合成** 根据 PRRSV 的基因序列和 pBV220 的酶切图谱,通过 DNA 同源性、酶切位点、ORF 及模拟表达分析,设计了一对能够合成 MN 蛋白基因及含有 EcoRI 和 BamHI 酶切位点的 PCR 引物,上游引物(P₁)序列为 5'CCG AAT TCC AGA GTT TCA GCG G3',下游引物为 5'TGG GAT CCA CCA CGC ATT CTT C3'。

收稿日期:1998-05-27,修回日期:1998-08-17

* 中华农业科教基金资助项目

1.5 MARC-145 细胞培养和 PRRSV 的制备 参考 Kim HS 介绍方法^[5], MARC-145 细胞培养选用 DMEM 培养基, 含 10% 犊牛血清, 100 u/mL 的青霉素和链霉素, 长成单层后接种 1:10 稀释的 PRRS 弱毒, 37℃ 培养 72 h, 出现显著的 CPE 后收获。经三次冻融处理, 8 000 r/min 离心 15 min, 取上清, 45 000 r/min 离心 2 h, 用原体积 1/20 的 TE 缓冲液 (10 mmol/L Tris-HCl pH 8.0, 1.0 mmol/L EDTA) 稀释沉淀, -20℃ 保存备用。

1.6 病毒 RNA 的制备 按侯云德介绍方法进行^[6]。

1.7 PRRSV 高免血清制备 将纯化的 PRRSV 制成油乳剂。油相用 10 号白油、司本 80、硬脂酸铝。水相将纯化的 PRRSV 加 2% 的吐温 80。油相和水相按比例混合后乳化成油包水乳剂。选择健康成年公兔 2 只, 间隔一周免疫一次, 共免疫 4 次, 初次免疫用 0.5 mL/只, 以后每次递增 0.5 mL/只。作分点肌肉或皮下注射。第 4 次免疫后 10 d 颈动脉放血分离血清。琼脂扩散试验测定血清效价, 备用。

1.8 pBVMN 表达质粒的构建 以 PRRSV RNA 为模板, 参照 Promega 的 RT-system 操作说明进行反转录合成 cDNA。再以 cDNA 为模板, 作 PCR 反应, 94℃ 变性 1 min, 55℃ 复性 1 min, 72℃ 延伸 1 min。pBV220 质粒制备按常规方法^[7], 扩增出的 MN 蛋白基因片段和 pBV220 质粒分别经 EcoRI 和 BamHI 酶切, 然后进行连接反应, 构建重组质粒 pBVMN, 转化入大肠杆菌 DH₅α。

1.9 MN 蛋白的表达及鉴定 酶切分析鉴定 pBVMN, 筛选出的阳性克隆进行温敏诱导表达。重组质粒菌经 30℃ 活化, 1:100 稀释到 LB 培养基, 30℃ 摇床增殖, 待浓度达到 OD₆₀₀ = 0.2~0.4 时, 迅速升温至 42℃ 继续振荡培养 4~6 h。取表达菌液 1.5 mL 8 000 r/min 离心 5 min, 去上清, 用 0.05 mol/L pH 7.2 PBS 100 μL 稀释沉淀, 加入溶菌酶使含量为 500 μg/mL, 37℃ 1 h, 冻融三次, 15 000 r/min 10 min, 弃上清。沉淀用变性液稀释 (8 mol/L 尿素, 50 mmol/L β-巯基乙醇, pH 7.5 0.1 mol/L PBS)。加等量 2 倍蛋白载样液, 沸水浴煮沸 10 min 后上样进行 SDS-PAGE 电泳^[7]。分离胶用 12%, 积层胶用 5%, 80V 电泳 1 h, 150V 电泳 3 h, 考马斯亮蓝染色。用光密度扫描仪对表达量进行估算。同时用未染色的分离胶作 Western-blot^[7], 对表达蛋白作进一步鉴定。

Western-blot 采取半干转移, 用转移电泳仪 DY III 7B 型 (北京六一仪器厂), 半干转移电泳槽 (Semi-dry transfer cell, U. S. A) 进行转移, 硝酸纤维素膜为 Boehringer Mannheim 公司产品, 电压 5V, 电流 1 mA/cm², 转移 1.5 h, 转移后, 加 2% BSA pH 7.5 PBS 封闭 37℃ 2 h, 加 1:100 兔抗 PRRSV 高免血清, 4℃ 过夜, 37℃ 1 h, 0.02% 吐温 80 pH 7.4 PBS 漂洗 2 次加羊抗兔 HRP 酶标抗体 37℃ 1 h, 漂洗 2 次, 加 DAB 染色。

2 结果

2.1 RT-PCR 扩增产物及其重组质粒的鉴定 经 RT-PCR 扩增出的 MN 基因片段约为 900 bp (图 1), 与试验设计相同。重组质粒 pBVMN 经限制性酶消化鉴定获得的 DNA 片段与扩增产物大小一致 (图 2), 初步证明为 MN 蛋白基因。序列分析证实所克隆的基因片段阅读框架与报道一致^[8] (另文报道)。

2.2 SDS-PAGE 和免疫印迹 重组质粒 pBVMN 在 P_RP_L 双强启动子控制下进行温控表达, 表达产物经 SDS-PAGE 电泳和考马斯亮蓝染色分析, 显示一条约 34 kD 大小的表达蛋白染色带 (图 3), 与试验设计相同。经 Western-blot 免疫印迹分析, 该蛋白带与兔抗 PRRSV 高免血清反应, 而与 pBV220 质粒菌体裂解液不发生反应 (图 4)。对染色凝胶进行光密度扫描, 表明表达蛋白约占整个菌体的 12%。

3 讨论

PRRSV 根据基因结构的不同划分为美洲型和欧洲型。M 和 N 基因是 PRRSV 中较保守的片段^[4], 各种分子生物学诊断方法都缘于这段基因^[9,10], 克隆这两种蛋白的基因进行表达是研究的热点。M 和 N 蛋白属非糖基化蛋白, 分子量分别为 19 kD 和 15 kD。这两种蛋白基

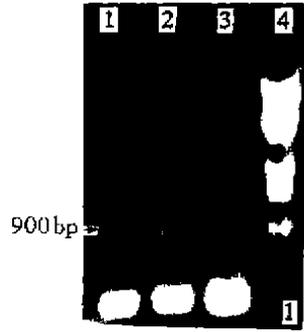


图1 RT-PCR 产物的 1.5% 琼脂糖凝胶电泳分析
1-3. MN cDNA 片段; 4. λ DNA EcoRI/Hind III Markers
Fig.1 Ethidium bromide-stained 1.5% gel showing RT-PCR Product.
Lane: 1-3 MN cDNA fragment; Lane 4. λ DNA EcoRI/Hind III Markers

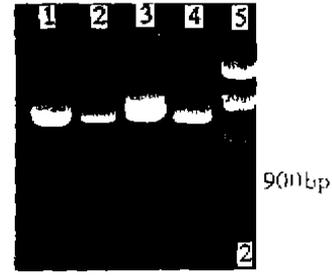


图2 pBV220 重组质粒 EcoRI/BamHI 酶切鉴定
1. pBV220 质粒 2-4. EcoRI 和 BamHI 消化的重组质粒, 4 为克隆筛选的阳性质粒, 5. λ DNA EcoRI/Hind III Markers
Fig.2 Identification of the recombinant plasmid PBVMN with digestion of EcoRI and BamHI. Lane1. pBV220 plasmid; Lane 2 to 4 recombinant plasmids digested by EcoRI and BamHI. Lane 4. cloned pBV220 plasmid digested by EcoRI and BamHI. Lane 5. λ DNA EcoRI/Hind III Markers

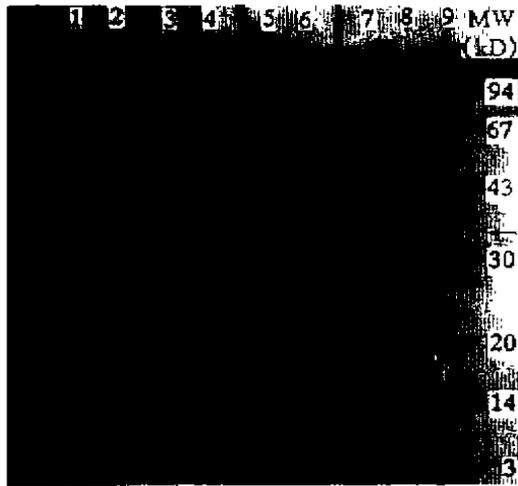


图3 pBV220 表达产物的 SDS-PAGE 电泳分析
1-2. pBV220; 3. pBV220 诱导前; 4-8 pBV220 诱导后;
9. 蛋白分子量标准
Fig.3 Analysis of pBV220 expression products by SDS-PAGE
Lane 1-2 pBV220; Lane 3. uninduced pBV220; Lane 4-8 induced pBV220; Lane 9 Markers of protein molecular weight



图4 pBV220 阳性克隆表达产物的 Western-blot 分析
1. pBV220; 2. 诱导前的 pBV220; 3. 诱导后的 pBV220.
Fig.4 Immunoblotting analysis of expression products of pBV220 recombinant plasmid
Lane 1. pBV220, Lane 2 uninduced pBV220; Lane 3 induced pBV220

因已分别克隆于杆状病毒载体进行表达, 并用于诊断^[11]。本研究是将 M 和 N 蛋白基因同时克隆于原核表达载体 pBV220, 一方面简化操作, 另一方面力图提高表达产物在诊断中的敏感度, 同时也为今后基因分段剪切克隆、表达、诊断等创造良好条件。结果与设计相符, 展示出良

好的应用前景。

M和N蛋白是PRRSV的两种表面结构蛋白,与其它结构蛋白相比,在诊断和基因分型上有更重要的意义。现已研制出相应的单克隆抗体^[12]。M和N基因重组于pBV220进行表达尚未见报道。pBV220是我国学者构建的一种高效表达载体,含有双强启动子 $P_{R}P_{L}$ 和多克隆位点,已有多种外源基因在pBV220中得到高效表达^[13],表达产物量多在10%~20%。本研究选择了常用的内切酶EcoRI和BamHI酶切位点,成功地克隆进MN基因,表达产物与兔抗PRRSV高免血清发生反应,论证了MN蛋白具有较强的免疫原性,需要进一步探讨表达产物的纯化及诊断上的应用。

pBV220载体适应的宿主菌较多,有必要进一步筛选适宜于MN蛋白表达的宿主菌,提高表达产物量,为诊断抗原的研制应用等奠定基础。

参 考 文 献

- 1 郭宝清,陈意水,刘文兴等.从疑似PRRS流产胎儿分离猪生殖和呼吸综合征病毒(PRRSV)的研究.中国畜禽传染病,1996(2):1~3
- 2 姜平,陈溥言,李宝祥等.我国猪繁殖和呼吸综合征流行病学调查及病毒分离.南京农业大学学报,1996(3):118
- 3 Conzelmann KK, Visser N, Van Woensel PV *et al.* Molecular characterization of porcine reproductive and respiratory syndrome virus, a member of the Arterivirus group. *Virology*, 1993, 193:329~339
- 4 Meng XJ, Paul PS, Haller PG *et al.* Phylogenetic analysis of the putative N (ORF6) and N (ORF7) genes of porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV): implication for the existence of two genotypes of PRRSV in the USA and Europe. *Arch Virol*, 1995, 140:745~755
- 5 Kim HS, Kwang J, Yoon IJ *et al.* Enhanced replication of porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) virus in a homogeneous subpopulation of MA-104 cell line. *Arch virol*, 1993, 133:477~483
- 6 侯云德,杨崇泰,吴淑华等.病毒基因工程的原理与方法.第二版.北京:人民卫生出版社,1985:73~79
- 7 萨姆布鲁克E,弗里奇EF,曼尼阿蒂斯T等著,金冬雁,黎孟枫,侯云德等译校.分子克隆实验指南.第二版.北京:科学出版社,1992:19~23,880~897
- 8 Maradassi H, Mounir S, Dea S *et al.* Molecular analysis of the ORFs 3 to 7 of porcine reproductive and respiratory virus, Quebec reference strain. *Arch Virol*, 1995, 40:1445~1418
- 9 Rente-larochelle, Maradassi H, Dea S. Detection of porcine reproduction and respiratory syndrome virus in cell cultures and formalin-fixed tissues by *in situ* hybridization using a digoxigenin-labeled probe. *J Vet Diagn Invest*, 1996, 8:3~10
- 10 Suarez P, Zaritaya R, Prieto C *et al.* Direct detection of the porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) virus by reverse polymerase chain reaction (RT-PCR). *Arch Virol*, 1994, 135:89~94
- 11 Nieuwstadt APV, Meulenber JJM, Essen-Zanbergen AV *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 Virol*, 1996, 70:4767~4772
- 12 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. *Veterinary Microbiology*, 1996, 51:257~266
- 13 张智岩,姚立红,侯云德.含 $P_{R}P_{L}$ 启动子的原核高效表达载体的组建及其应用.病毒学报,1990,6(2):111~116

Expression of the M and N Protein Gene of Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus in *E. coli*

Cai Jiali² Cai Baoxiang¹ Jiang Pin¹

(*Animal Medical College, Nanjiang Agricultural University, Nanjiang 210095*)

Abstract The primers for RT-PCR were designed on the basis of M and N gene sequence of PRRSV. A gene fragment about 900 bp, which has digestion sites of EcoRI and BamHI, was amplified by RT-PCR. The M and N gene were cloned into expression vector pBV220 and one recombinant PBVMN was constructed which highly expressed a 34 kD protein in *E. coli* DH₅ α . The expressed product was identified by SDS-PAGE and Western blotting, which occupies 12% of total bacterial protein. The report has laid a basis for the development of molecular diagnostic antigen of PRRSV.

Key words Porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV), pBV220, Expression, M protein, N protein