

猪繁殖与呼吸综合征病毒 N 基因的克隆及高效表达*

许立华^{1,2}, 芦银华¹, 胡志华¹, 苏鑫铭¹, 苏春霞³, 陈溥言^{1**}

(1. 南京农业大学农业部畜禽疫病诊断与免疫重点开放实验室, 江苏南京 210095; 2. 宁夏大学农学院动物科学系, 宁夏银川 750105; 3. 西北农林科技大学, 陕西杨凌 712100)

Cloning and Expression of Nucleocapsid Protein Gene of *Porcine reproductive and respiratory syndrome virus* in *E.coli*XU Li-hua^{1,2}, LU Yin-hua¹, HU Zhi-hua¹, SU Xin-ming¹, SU Chun-xia³, CHEN Pu-yan^{1**}

(1. Key Laboratory of Animal Disease Diagnosis and Immunology, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China; 2. Animal Science Department of Agricultural College of Ningxia University, Yinchuan 750105, China; 3. North-West Sci-Tech University of Agriculture and Forestry, Yangling 712100, China)

Abstract: The gene of nucleocapsid protein of *Porcine reproductive and respiratory syndrome virus* (PRRSV) VR2332 strain was amplified by RT-PCR. The PCR product was purified and digested with *Bam*H I and *Xho* I, then directly cloned into the prokaryotic vector pET32a. Consequently the recombinant plasmid was constructed, designated pETN. PETN was transformed into the host cell BL21 (DE3) and the expression procedure was optimized including cultivated temperature, optional induction concentration and time of IPTG. The result indicated that the nucleocapsid protein can be expressed efficiently with 0.8mmol/L IPTG and 4-hour induction.**Key word:** *Porcine reproductive and respiratory syndrome virus*; Nucleocapsid protein gene; Amplification; Recombiant prokaryotic expression plasmid**摘要:** 本试验参照 GenBank 公布的 *Porcine reproductive and respiratory syndrome virus* (PRRSV) VR2332 株的核苷酸序列, 设计并合成了一对引物, 应用 RT-PCR 方法扩增出了 PRRSV 的核衣壳蛋白基因 (N 基因)。在对 N 基因及 pET32a 载体双酶切后进行连接, 构建了高效原核表达载体 pETN。将 pETN 重组质粒转化 BL21 (DE3) 宿主菌后, 对培养条件及诱导表达条件 (IPTG 最佳浓度、作用时间) 等影响表达的因素进行优化, 实现了 PRRSV 核衣壳蛋白基因的高效表达。**关键词:** 猪繁殖与呼吸综合征病毒; 核衣壳蛋白基因; 扩增; 原核表达载体

中图分类号: S852.65

文献标识码: A

文章编号: 1003-5125 (2003) 03-0279-04

猪繁殖与呼吸综合征 (Porcine reproductive and respiratory syndrome, PRRS) 是上一世纪八十年代后期发现的对世界养猪业构成严重威胁的一种传染病^[1, 2]。本病的特征是妊娠母猪流产、早产、死产及木乃伊胎, 而仔猪则主要以咳嗽、呼吸困难等呼吸道症状为主^[2]。因为本病可经水平及垂直两种方式传播, 由此而造成的损失已引起人们的日益关注。猪繁殖与呼吸综合征病毒 (*Porcine reproductive and respiratory syndrome virus*, PRRSV) 存在两种基因型, 即北美洲型 (以 VR2332 为代表株) 和欧洲型 (以 LV 为代表株)。PRRSV 核衣壳蛋白基因 (N 基因) 在两种基因型中是高度保守的, N 基因所编码的核衣壳蛋白 (N 蛋白) 具有良好的免疫原性及反应原性^[3, 4], 这为本病的诊断提供了重要的分子

收稿日期: 2002-11-01, 修回日期:

* 基金项目: 国家“863”高技术发展计划资助项目 (2001AA249012)

作者简介: 许立华 (1972-), 男, 宁夏永宁籍, 讲师, 硕士生, 主要从事动物分子病毒学与疫病诊断方法的研究。

** 通讯作者。Correspondence author.

生物学及免疫学依据。本试验构建了 N 基因的原核高效表达载体, 为本病新型诊断方法的建立创造了良好的物质条件。

1 材料与方 法

1.1 试验材料

1.1.1 病毒、细胞及载体: PRRSV 为本室保存毒株: Marc-145 细胞购自中科院武汉病毒所; 原核表达载体 pET32a 质粒为本室保存; 宿主菌 BL21 (DE3) 为本组保存。

1.1.2 主要试剂及工具酶: 病毒总 RNA 提取试剂盒购自罗氏诊断试剂公司; 限制性内切酶 *Bam*H I、*Xho* I、反转录酶 M-MLV、TaqDNA 聚合酶均购自大连宝生物工程有限公司; 培养细胞用 DMEM 为 GIBCO 公司出品, 小牛血清购自郑州佰安生物工程有限公司。

1.1.3 扩增目的基因片段所用引物: 参照 GenBank 公布的 PRRSV VR2332 核苷酸序列, 自行设计并由大连宝生物工程有限公司合成一对引物, 为便于基因的克隆及构建表达载体等后续工作, 在引物 P1 中加入 *Bam*H I 酶切位点, 引物 P2 中加入 *Xho* I 酶切位点:

上游引物 P1

5'-GCGGATCCATGCCATCTAACAAC-3'

*Bam*H I

下游引物 P2

5'-AGCTCGAGTCAGGCTAGGGATGA-3'

Xho I

1.2 方法

1.2.1 接种病毒: 将本室保存的 PRRSV 反复冻融三次, 离心后取上清接种于已长成单层的 Marc-145 细胞上, 此时加入含 2% 血清的 DMEM 营养液于 37℃, 5%CO₂ 条件下培养, 72h 后, 当出现 75% 以上细胞病变 (CPE) 时收获病毒, 冻融三次, -20℃ 下保存备用^[5]。

1.2.2 PRRSV 核衣壳蛋白基因的扩增: 取 500μL 病毒悬液, 按罗氏诊断试剂公司病毒总 RNA 提取试剂盒操作说明进行。提取的病毒总 RNA 立即进行 RT-PCR。每管中加入已提取的病毒总 RNA 9.2μL, 5×Buffer 4μL, 10mmol/L dNTP 2μL, 25mmol/L MgCl₂ 0.8μL, RNasin 1.0μL, P1 及 P2 各 1.0μL, 在 PCR 仪 (AmpGene 公司) 上 65℃ 15min 后加入反转录酶 M-MLV 1.0μL, 后 42℃ 1h, 94℃ 5min 后结束反应, 总体积为 20μL。在反应管中依次加入 25mmol/L MgCl₂ 1.4μL, 10×

Buffer 4.0μL, Taq 酶 0.6μL, 反转录产物 10μL, DEPC 处理的超纯水 34μL, 在 PCR 仪 (AmpGene 公司) 上设置 94℃ 5min, 随后 94℃ 1min, 51℃ 1min, 72℃ 1.5min, 共 25 个循环, 结束循环后 72℃ 10min。对 PCR 产物进行琼脂糖凝胶电泳鉴定。按胶回收试剂盒 (上海华舜生物工程有限公司) 使用说明进行回收, 并对回收产物进行电泳鉴定。

1.2.3 pET32a 质粒的提取: 按《分子克隆实验指南》上的碱裂解法提取^[6]。

1.2.4 重组质粒 pETN 的构建: 目的基因片段及质粒载体的双酶切按常规方法操作^[6, 7]。采用酚: 氯仿法抽提酶切产物。向反应管中加入已经酶切并抽提的基因片段 4.0μL, 经同样处理的双酶切质粒 1.0μL, T₄DNA 连接酶 1.0μL, 加入去离子水至总体积 10μL, 同时设双酶切载体的对照, 于 16℃ 下过夜^[7]。按《分子克隆实验指南》介绍方法制备新鲜的 BL21 (DE3) 感受态细胞, 并按常规方法进行转化^[6]。自氨苄平板上挑取单菌落, 接种于 LB 培养基 (Amp 50μg/mL), 在 30℃ 振荡培养 10-13h, 按碱裂解法提取质粒并进行双酶切, 随即电泳鉴定。重组质粒转化 BL21 (DE3) 宿主菌后, 取培养物送交大连宝生物工程有限公司完成测序工作; 测序结果用 DNASTAR 分析软件与 GenBank 公开序列进行同源性分析。

1.2.5 确定最佳诱导条件: 对筛选出重组质粒的培养物于 30℃ 振荡培养, 至 OD 值达 0.4~0.5 时加入不同浓度 IPTG 在 37℃ 诱导 3h, 随后收取表达产物进行 SDS-PAGE 电泳。在 100mL 培养物中加入 IPTG 至最佳诱导浓度, 于 37℃ 振荡培养, 取不同时间段 (诱导表达 1、2、3、4、5、6h) 的表达产物各 1mL 进行 SDS-PAGE 电泳。

1.2.6 表达产物的 Western-Blot 试验: 采取最佳诱导条件进行诱导表达并对表达产物处理后, 按常规方法操作^[6]。

2 结果

2.1 目的基因片段的扩增

电泳结果显示: 在目标条带区域出现单一且亮度很高的条带。

2.2 双酶切鉴定重组质粒

双酶切产物电泳后, 在紫外光灯下出现一大一小两个片段, 其中小片段所处位置与目标基因片段大小一致, 表明该重组质粒已构建成功。电泳结果见图 1 所示:

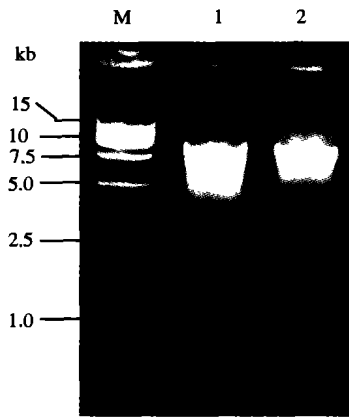


图1 重组质粒 pETN 的酶切鉴定

M, DNA 分子量标准; 1, *Bam*H I、*Xho* I 酶切的重组质粒 pETN; 2, *Bam*H I、*Xho* I 酶切的 pET32a 质粒。

Fig.1 Identification of recombinant plasmid pETN

M, DNA molecular weight marker; 1, Recombinant plasmid pETN digested by *Bam*H I and *Xho* I; 2, pET32a plasmid digested by *Bam*H I and *Xho* I.

2.3 插入片段与已知序列的同源性比较

应用分析软件将测得序列与本组分离的 PRRSV 毒株及 VR2332 株的 ORF7 片段核苷酸序列进行比较。结果显示, ORF7-1 为插入片段序列, ORF7-2 为分离毒株的 ORF7 序列(已测序), ORF7-1 与 VR2332 ORF7 核苷酸序列同源性达 99.9%, 与分离毒株同源性达到 99%。这一结果显示插入片段的正确性, 也证实了 RT-PCR 的特异性。此外, 该结果提示本组保存的病毒及分离的毒株是源自 PRRSV VR2332 代表株的。

2.4 IPTG 诱导表达最佳浓度的确定

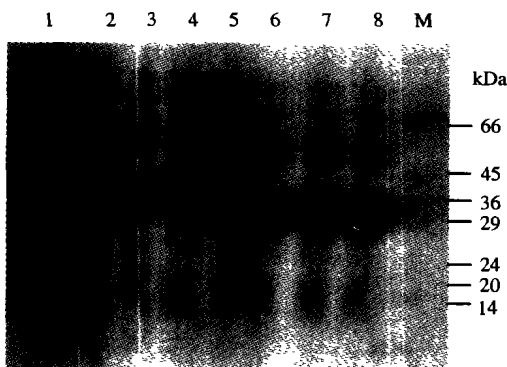


图2 IPTG 诱导最佳浓度的电泳确定

M, 蛋白质分子量标准; 1-8 分别为 0.1、0.3、0.4、0.5、0.6、0.8、0.9、1.0mmol/L IPTG 诱导表达产物

Fig.2 Optional induction concentration of IPTG determined by SDS-PAGE

M, Protein marker; Lane 1-8 induced respectively with 0.1, 0.3, 0.4, 0.5, 0.6, 0.8, 0.9 and 1.0mmol/L of IPTG concentrations.

分别用 0.1, 0.3, 0.4, 0.5, 0.6, 0.8, 0.9, 1.0mmol/L IPTG 于 37℃ 下对 100mL 培养物诱导表达 3h, 随后进行 SDS-PAGE 电泳。由图 2 可以看出终浓度为 0.8mmol/L 时 IPTG 诱导表达的产量远高于前几个浓度下诱导表达的产量, 而与 0.9、1.0mmol/L 的 IPTG 诱导表达的产量相当。最终确定 0.8mmol/L 的终浓度为 IPTG 诱导表达最佳浓度。

2.5 IPTG 诱导表达最佳作用时间的确定

在 100mL 培养物中加入 IPTG 至终浓度为 0.8mmol/L, 于 37℃ 振荡培养, 取不同时间段的表达产物进行 SDS-PSGE。电泳结果见图 3。

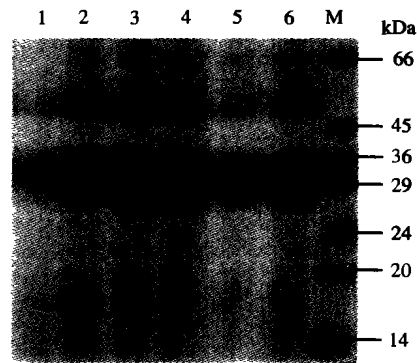


图3 IPTG 诱导最佳作用时间的电泳确定

M, 蛋白质标准; 1-6, 分别为诱导 1-6h 的表达产物。

Fig.3 Time course of expression of PRRSV N gene induced with IPTG

M, Protein marker; 1-6, Expression products of 1, 2, 3, 4, 5, 6 hours induced by IPTG, respectively.

结果显示: 诱导 4h 的产量明显高于诱导 1~3h, 且与诱导 5~6h 的产量相差不显著, 确定 4h 为 IPTG 最佳作用时间。

2.6 Western-Blot 试验

经 Western blot 检测, 在目标条带所处位置 (33kDa 左右) 出现一棕红色印迹, 证实了表达产物的特异性。结果见图 4:



图4 表达产物的 Western-blot 试验

Fig.4 Western-blot test of expression product

3 讨论

猪繁殖与呼吸综合征 (PRRS) 于 1987 年首先发生于美国北卡罗莱纳州, 随后很快蔓延到北美大陆, 现在本病广泛存在并流行于世界各主要养猪国家和地区。各国学者在本病的研究上也取得丰硕的成果。笔者所在实验室运用分子生物学技术, 对在两个基因型的 PRRSV 中都相当保守的核衣壳蛋白基因进行扩增与克隆, 连接到 pET 系列载体中的 pET32a, 构建了可高效表达目标蛋白的重组载体 pETN。从表达产量来看, 完全可以满足后期建立诊断方法的需求^[3, 4, 8]。pET32a 质粒具有编码大肠杆菌硫氧还蛋白的基因片段, 该蛋白可促进目标蛋白的融合表达, 此外, pET32a 质粒具备的连续编码六个组氨酸的编码区这一特点为使用 His-Binding 纯化层析柱纯化目的蛋白创造极为便利的条件。

本试验对目的蛋白—核衣壳蛋白的高效稳定表达方面做了一些深入的探索。笔者认为, 在诱导表达之前, 将培养物置于 30℃ 培养, 可以显著增加重组质粒在宿主菌内的拷贝数, 而 IPTG 诱导表达最佳浓度 (0.8mmol/L)、作用时间 (4h) 的确定, 使大量获得 PRRSV 核衣壳蛋白成为可能, 为新型诊断方法的建立提供了物质保证。

参考文献

- [1] Wensvoort G, Terpstra C, PO J M A, *et al.* Mystery swine disease in the Netherlands: isolation of lelystac virus [J]. *Vet Q*, 1991, 3: 121-130.
- [2] Collins J E, Benfield D A, Christianson W T, *et al.* Isolation of swine infertility and respiratory syndrome virus in virus in North America and experimental reproduction of the disease in gnotobiotic pigs [J]. *J Vet Diagn Invest*, 1992, 4: 117-126.
- [3] Denac H, Moser C, Tratschin J D, Hofmann M A, *et al.* An indirect ELISA for the Detection of antibodies against porcine reproductive and respiratory syndrome virus using recombinant nucleocapsid protein as antigen[J]. *J Virol Methods*, 1997, 65, 169- 181.
- [4] Dea S, Wilson L, Therien D, *et al.* Competitive ELISA for detection of antibodies to porcine reproductive and respiratory syndrome virus using recombinant E.coli expressed nucleocapsid protein as antigen[J]. *J Virol Methods*, 2000, 87, 109- 122.
- [5] 殷震, 动物病毒学[M]. 第二版. 北京: 科学出版社. 1997, 204-230.
- [6] 金冬雁, 黎孟枫. 分子克隆实验指南[M]. 第二版, 北京: 科学出版社. 1999.
- [7] 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.
- [8] 刘光清, 蔡雪晖, 仇华吉, 等. 猪繁殖与呼吸综合征的研究进展[J]. *中国预防兽医学报* 2001, 23(1): 72-76.