维普资讯 http://www.cqvip

第19卷5期
2004年10月

中国病毒学
VIROLOGICA SINICA

19（5）：476-480
October 2004

猪繁殖与呼吸综合征病毒 *orf7* 和 *orf5* 双基因的原核表达研究*

乐 敏，邱德新**，陈焕春，蒋增海

（华中农业大学动物医学院动物病毒室，湖北武汉 430070）

Expression of the Combined orf7 and orf5 Genes of Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus in *E.coli.*

YUE Min，QIU De-xin**，CHEN Huan-chun，JIANG Zeng-hai

(Lab of Animal Virology，College of Veterinary Medicine，Huazhong Agricultural University，Wuhan 430070, China)

Abstract: According to the nucleotide sequence of *Porcine reproductive and respiratory syndrome virus* (PRRSV), two pairs of primers were designed and used to amplified the orf7 and orf5 genes by RT-PCR, respectively. By using the *Eco*RI、*Spe*I and *Hin*d III sites, both genes were cloned into pMD-18T vector in turn, then sequencing and comparing the homologies of the cloning genes. The combined *orf7* and *orf5* genes was subcloned into a prokaryotic expressing vector pGEX-KG, the recombinant plasmid named pGEX-KGNE was constructed and transformed into *E.coli* BL21.The results of SDS-PAGE and Western-blot indicated that the combined genes of *orf7* and *orf5* and Glutathion-S-transferase (GST) was expressed in *E.coli* BL21 as a fusion protein GST-NE about 64kDa in molecular weight, and this fusion protein showed reactive activity immunologically. This study lays a foundation for the development of the serodiagnostic methods and vaccines for PRRSV.

Keywords: *Porcine reproductive and respiratory syndrome virus*; orf7; orf5; Expression of two genes in *E.coli.*

摘要：根据PRRSV已知序列设计两对引物，采用RT-PCR方法分别扩增orf7和orf5基因片段。利用*Eco*RI、*Spe*I和*Hin*d III位点将*orf7*和*orf5*基因片段依次克隆到pMD-18T载体，构建成重组质粒pMD18NE，并比较所克隆基因序列的同源性。将串联的orf7和orf5基因亚克隆到原核表达载体pGEX-KG，构建重组原核融合表达质粒pGEX-KGNE，并转化BL21，SDS-PAGE和Western-blot分析表明：orf7和orf5基因与GST获得了融合表达，并且表达的融合蛋白GST-NE具有免疫学反应活性，这为猪繁殖与呼吸综合征血清学诊断方法的建立及疫苗研究打下基础。

关键词：猪繁殖与呼吸综合征病毒；orf7；orf5；双基因原核表达

中图分类号：S852.65　　**文献识别码**：A　　**文章编号**：1003-5125(2004)05-0476-05

猪繁殖与呼吸综合征是由猪繁殖与呼吸综合征病毒(*Porcine reproductive and respiratory syndrome virus*, PRRSV)引发的一种新的病毒性传染病，以母猪发热、厌食、早产、流产、死胎、弱仔等繁殖障碍及仔猪呼吸系统疾病和高死亡率为特征[1]。该病最早于1987年报道于美国南部，不久便在全美迅速蔓延。随后加拿大、德国、荷兰等一些国家也先后暴发该病[1,2]。亚洲地区中国台湾1991年出现此病，日本1994年暴发PRRS，中国大陆1996年报道此病开始流行并分离到病毒[3~5]。随着国际贸易日益密切，PRRS已成为世界性疾病，几乎存在于世界上每一个养猪国家，给世界养猪业造成了巨大的经济损失。

PRRSV属尼多病毒目（*Nidovirales*）动脉炎病

收稿日期：2004-03-17，修回日期：2004-05-20
* 基金项目：湖北省“十五”科技攻关资助项目（2001AA202A04）；华中农业大学大学生科技创新基金重点资助项目(2003A052).
作者简介：乐敏（1982-），男，湖北武汉籍：2001级动物医学专业学生。
** 通讯作者：邱德新（1967-），男，湖北孝感籍，博士，副教授：主要从事动物病毒分子生物学和生物病毒病诊断方法研究。
Corresponding author. Tel：027-87280471；E-mail：dxqiucn@mail.hzau.edu.cn

维普资讯 http://www.cqvip.c

毒科(*Arteriviridae*)成员，是一种有囊膜单股正链 RNA 病毒，基因组约 15kb，含有 7 个开放阅读框架 ORFs（open reading frames），其中 orf1 编码 PRRSV 的复制酶蛋白，orf2～7 编码结构蛋白，其中 N 蛋白（由 orf7 编码）在所编码的 6 种结构蛋白中最为保守，并且在 PRRSV 结构蛋白中含量最高（占 20%～40%），分子量为 14～15kDa，有很强的免疫原性，在猪感染 PRRSV 或免疫 PRRSV 疫苗后，血清中针对 N 蛋白的抗体出现最早且抗体水平也最高[6]；由 orf5 编码的 E 蛋白（GP5）为糖基化囊膜蛋白，分子量为 24.5～26kDa[7]。Pirzadeh 等（1998）发现由人巨细胞病毒启动子驱动的表达 PRRSV GP5 的质粒免疫猪能诱导抗 GP5 的特异性抗体的产生，且产生的中和抗体与 GP5 的量呈线性相关[8]，说明针对 GP5 的抗体水平能反映动物机体对 PRRSV 的免疫力情况。因此，对 PRRSV 的 *orf7* 基因和 *orf5* 基因进行了克隆测序和原核表达研究，为下一步的相应血清学诊断方法的建立及相关方面疫苗的研究奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

MARC-145 细胞（非洲绿猴肾传代细胞）为本研究室传代保存，用于增殖 PRRSV 的 DMEM 培养基购自 G1BCO 公司；PRRSV 克隆 20 株（为本研究室自临床病料分离得到的 PRRSV 毒株中克隆得到增殖效率较高的毒株），PRRSV 高免血清、辣根过氧化物酶标记兔抗猪 IgG (ELISA 工作浓度为 1:20000)及大肠杆菌 DH5α 和 BL21 均由本研究室保存提供；RNA 抽提试剂盒和 RT-PCR 试剂盒购自 QIAGEN 公司；DNA 回收试剂盒、工具酶及克隆载体 pMD18-T 均购自大连宝生物公司；原核表达载体 pGEX-KG 为谷胱苷肽转移酶（Glutathione-S-transferase, GST）融合表达载体，由本室肖少波博士提供。引物根据 GenBank 的 PRRSV 基因序列设计，由上海生工公司合成，*orf7* 基因上游引物 P71：5'CGA TGA ATT CAT ATG CCA AAT AAC AAC G 3'(下划线部分为 *Eco*RI 酶切位点)，下游引物 P72：5'CAT GAC TAG TTG CTG AGG GTG ATG CTG TGA CGC G 3'(下划线部分为 *Spe*I 酶切位点)；*orf5* 基因上游引物 P51：5'GCA ACT AGT ATG TTG GAG AAA TGC TTG ACC 3'(下划线部分为 *Spe*I 酶切位点),下游引物 P52：5'GCA TAA GCT TAG AAG TCA TCT AAG GAC GAC CCC 3'(下划线部分为 *Hin*d III酶切位点)。

1.2 PRRSV 基因组 RNA 的提取

PRRSV 基因组 RNA 的提取按文献所述方法进行[9]。

1.3 *orf7* 和 *orf5* 片段的扩增

用设计的引物 P71、P72、P51 和 P52 分别进行 RT-PCR，orf7 的 RT 反应条件为 50℃ 30min, PCR 条件为 94℃ 5min, 94℃ 1min, 55℃ 1min, 72℃ 1min, 35 个循环，然后 72℃延伸 10min。orf5 的 RT 反应条件为 50℃ 30min, PCR 条件为 95℃ 5min, 95℃ 1min, 56℃ 1min, 72℃ 1min, 35 个循环，然后 72℃延伸 10min。

1.4 扩增产物的电泳和回收

RT-PCR 产物进行琼脂糖凝胶电泳，orf5 扩增片段大小约 600bp，消除了终止密码的 orf7 大小约 400bp；orf7 和 orf5 片段的回收按 DNA 回收试剂盒说明书进行。

1.5 *orf7* 和 *orf5* 基因的克隆、鉴定和测序

将回收的 *orf7* 和 *orf5* 片段分别克隆到 pMD18-T 载体，构建质粒分别命名为 pMD18N 和 pMD18E，按常规方法转化大肠杆菌 DH5α 和提取质粒，用 *Eco*R I、*Spe* I 酶切鉴定重组质粒 pMD18N，用 *Spe* I、*Hin*d III酶切鉴定重组质粒 pMD18E，鉴定的阳性重组质粒分别进行测序，测序由大连宝生物公司完成。然后用 Blast 软件比较测序结果与其它 PRRSV 毒株相应基因同源性。

1.6 *orf7* 与 *orf5* 的连接及酶切鉴定

按 1.5 所述方法构建含消除终止密码 *orf7* 的重组质粒 pMD18N，然后用 *Spe* I、*Hin*d III分别双酶切重组质粒 pMD18N、pMD18E，将回收的 *orf5* 基因和线性化重组质粒 pMD18N 进行连接，通过 *Spe* I、*Hin*d III酶切位点实现 orf5 在 pMD18N 内的定向克隆，将 orf5 连接在消除了终止密码的 *orf7* 下游。以 *Eco*R I、*Hin*d III酶切鉴定重组质粒，构建的重组质粒为 pMD18NE。

1.7 *orf7* 和 *orf5* 双基因原核表达质粒的构建

提取质粒 pMD18NE，用 *Eco*R I、*Hin*d III分别双酶切重组质粒 pMD18NE 和原核表达载体 pGEX-KG，回收 pMD18NE 释放的 *orf7* 和 *orf5* 串联片段及线性化的 pGEX-KG。按常规方法将回收的片段进行连结、转化和提取质粒，并用 *Eco*R I、*Hin*d III进行酶切鉴定；构建的重组质粒为 pGEX-KGNE。

1.8 重组融合蛋白 GST-NE 的诱导表达及检测

重组质粒 pGEX-KGNE 的转化（大肠杆菌 BL21）及其诱导表达，SDS-PAGE 检测和 Western-

维普资讯 http://www.cqvip.com

blot 分析均按文献所述方法进行[10]，Western-blot 所用一抗为 PRRSV 高免血清，二抗为辣根过氧化物酶标记兔抗猪 IgG（按 1:2000 稀释），DAB 显色。

2 结果

2.1 *orf7* 和 *orf5* 片段的扩增

用设计的 *orf7* 和 *orf5* 特异性引物分别进行 RT-PCR，扩增产物经琼脂糖凝胶电泳，可见大小约 400bp 和 600bp 的特异性扩增片段，与预期大小相符(图略)。

2.2 重组质粒 pMD18N 和 pMD18E 的酶切鉴定及 *orf7* 和 *orf5* 基因的测序

用 *Eco*R I、*Spe* I 双酶切质粒 pMD18N，可见约 2.7kb 和 400bp 两条带，*Eco*R I，*Spe* I 单酶切时可见一条约 3.1kb 的带(图 1)。质粒 pMD18E 用 *Spe* I、*Hind* III双酶切，可见约 2.7kb 和 600bp 两条带，*Spe* I，*Hind* III单酶切时只有一条大小约 3.3kb 的带(图 2)。对质粒 pMD18N 和 pMD18E 分别进行双向测序。序列显示所克隆的 orf7 基因编码区长 369bp，可编码 123 个氨基酸残基。orf5 基因（GenBank 登录号 U87392）编码区长 597bp，可编码 198 个氨基酸残基。

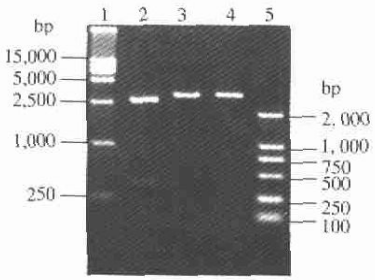

图 1 重组质粒 pMD18N 的酶切鉴定

Fig. 1 The identification of the pMD 18N

1, DL15, 000 DNA Marker; 2, pMD18N/*Eco*R I+*Spe* I; 3, pMD18N/*Spe* I; 4, pMD18N/*Eco*R I; 5, DL2,000 DNA Marker.

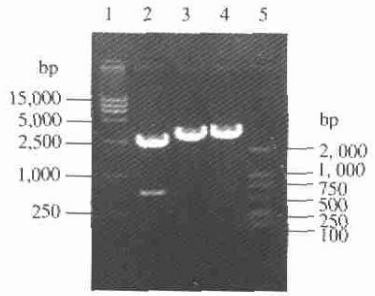

图 2 酶切鉴定重组质粒 pMD18E

Fig. 2 The identification of the pMD18E

1, DL15, 000 DNA Marker; 2, pMD18E / *Spe* I + *Hind* III; 3, pMD18E / *Spe*I; 4, pMD18E / *Hind* III; 5, DL2,000 DNA Marker.

经 Blast 软件分析，结果表明，所克隆的 orf7 片段核苷酸序列及其推导的氨基酸序列与 PRRSV 美洲型 ATCC VR-2332(GenBank 序列号为 AF030244) 株同源性为 100%，证明 orf7 是 PRRSV 基因组内很保守的序列。所克隆的 orf5 片段核苷酸同源性为 92%，氨基酸同源性为 91%，进一步证实本研究所用 PRRSV 克隆 20 株属美洲型 PRRSV。

2.3 重组质粒 pMD18NE 的酶切鉴定

用 *Eco*R I、*Hind* III分别单酶切和双酶切重组质粒 pMD18NE，结果如图 3。用 *Eco*RI 和 *Hind* III 单酶切都可得到一条约 3.7kb 的带，*Eco*R I，*Hind* III 双酶切则出现 2.7kb 的载体片段和约 1000bp 的外源片段（orf7 和 orf5 串联片段）两条带，表明 *orf7* 基因和 *orf5* 基因已被插入到 pMD18-T 载体内。

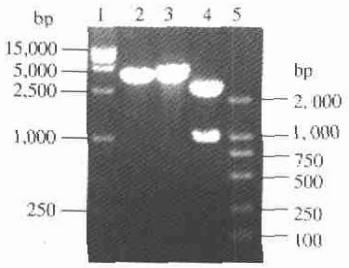

图 3 重组质粒 pMD18NE 的酶切鉴定

Fig. 3 The identification of the pMD18NE

1, DL15,000 DNA Marker; 2, pMD18NE/*Hind* III; 3, pMD18NE/*Eco*R I; 4, pMD18NE /*Eco*R I+*Hind* III; 5, DL2, 000 DNA Marker.

2.4 orf7 和 orf5 双基因表达载体的酶切鉴定及测序

用 *Eco*R I、*Hind* III酶切鉴定重组质粒 pGEX-KGNE，结果如图 4。用 *Eco*R I 和 *Hind* III单酶切均可见一条约 6.0kb 的带，*Eco*R I 和 *Hind* III双酶切则出现 5.0kb 的载体片段和约 1000bp 的外源片段（orf7 和 orf5 串联片段）两条带，序列测定结果与 2.2 所得结果一致（图略）。表明 *orf7* 和 *orf5* 双基因

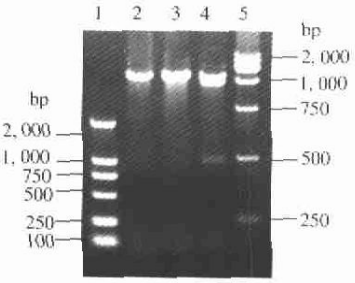

图 4 酶切鉴定重组质粒 pGEX-KGNE

Fig. 4 The identification of the recombination plasmid pGEX-KGNE with R.E.

1, DL2, 000 DNA Marker; 2, pMD18NE/*Hind* III; 3, *pMD18NE/EcoR* I; 4, pMD18NE/EcoR I+*Hind* III; 5, DL15, 000 DNA Marker.

维普资讯 http://www.cqvip.com

已被定向插入到原核表达载体 pGEX-KG 内，构建成重组原核表达质粒 pGEX-KGNE。

2.5 orf7 和 orf5 双基因表达产物 SDS-PAGE 检测和 Western-blot 分析

按 1.8 所述方法进行 SDS-PAGE 检测及 Western-blot 分析，结果如图 6。由图 6 可见，在 45kDa～66.2kDa 之间，重组质粒 pGEX-KGNE 比空白载体 pGEX-KG 明显多出一条分子量约为 64kDa 的蛋白带，表明 PRRSV 核衣壳蛋白（N 蛋白）和糖基化囊膜蛋白（E 蛋白）在大肠杆菌 BL21 中获得融合表达，因串联的 orf7 和 orf5 基因克隆在 pGEX-KG 内谷胱苷肽转移酶（Glutathione S-transferase,GST）读码框架下游，与分子量约 26kDa 的 GST 融合表达，表达的融合蛋白 GST-NE 大小约 64kDa，与预期结果相符。所表达的融合蛋白 GST-NE 与 PRRSV 阳性血清出现特异性 Westeron-blot 阳性带，表明在原核表达系统表达的融合蛋白 GST-NE 具有免疫学反应活性，适合用于建立 PRRS 的血清学检测方法。

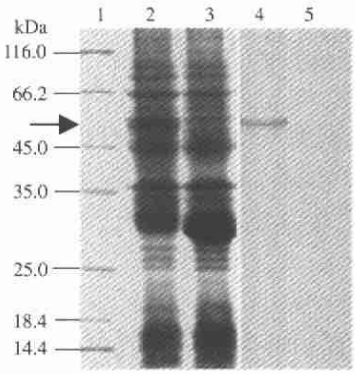

图 5 pGEX-KGNE 原核表达产物的检测

Fig. 6 The SDS-PAGE and Western-blot of product of pGEX-KGNE expressed in *E.coli*. BL21

1, Protein molecular weight marker; 2/4, pGEX-KGNE induced expression in BL21; 3/5, pGEX-KG induced expression in BL21.

3 讨论

PRRSV 自被发现短短十几年的时间内，由于高度的传染性，已在全世界造成广泛流行，成为世界养猪业的主要障碍。由于对 PRRSV 的认识还不够完全，其免疫预防仍然没有安全有效的方法。因此，对 PRRS 进行快速诊断就显得特别重要。检测猪群中的 PRRS 除了病原学方法以外，Boehringer 公司推出的 PRRS 全病毒作抗原的间接 ELISA 诊断试剂盒在目前临床上应用最广泛。

N 蛋白是 PRRSV 中相对保守，并且免疫原性很强的结构蛋白。PRRSV 感染猪后，产生的抗 PRRSV 的抗体中针对 N 蛋白的抗体水平最高，因此，为避免 PRRSV 全病毒使用带来散毒的危险，人们首先考虑用体外表达的 N 蛋白作为诊断抗原，并用大肠杆菌或杆状病毒表达的 N 蛋白做抗原建立 ELISA 诊断方法[11,12]。但随后的研究中发现，尽管 N 蛋白的免疫原性很强，但不参与中和抗体的产生。相比较而言，由 orf5 编码的 E 蛋白不仅刺激机体产生中和抗体，而且抗 E 蛋白的抗体也是最早产生的抗体之一，具有作为诊断靶抗原的价值。因此，Gonin 等（1999）报道用大肠杆菌表达的 E 蛋白建立 ELISA 等诊断方法[13]。用全病毒 ELISA 方法检测以 orf5 作为目标基因的 PRRSV 基因工程疫苗抗体，难以检测出针对 orf5 的抗体，这是因为在病毒粒子的纯化过程中 E 蛋白严重损失的缘故[13]。因此，有必要建立针对 E 蛋白的 ELISA 方法，一方面可反映机体抗体水平进行临床诊断，另一方面也为客观评价以 orf5 为基础的 PRRSV 新型基因工程疫苗的免疫反应提供检测工具。最近，本室邱德新博士在原核中成功高效表达 orf7 基因[9]，方六荣博士在昆虫细胞中高效表达经过修饰的 orf5 基因[14]。本研究借鉴两位博士的成功表达研究经验，进一步探讨将两个目标基因进行串联表达的研究，结果表明，串联的 orf7 和 orf5 与 GST 在原核表达系统获得了高效融合表达，且表达的融合蛋白 GST-NE 具有免疫学反应活性，这不仅为 PRRS 血清学诊断方法的建立提供优质价廉的靶抗原，也为进一步研究融合蛋白的生物学功能奠定基础。

参考文献

[1] Wensvoort 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] Bilodeau R, Dea S, Martineau G P, *et al*. Porcine reproductive and respiratory syndrome in Quebec [J]. Vet Rec, 1991, 129:102-103.

[3] 张志成，钟文彬. 台湾地区猪繁殖与呼吸道征候群 I 病毒鉴定[J]. 中华兽医杂志, 1993, 19(4): 268-276.

[4] Hiroyoshi Kuwaahara. An outbreak of PRRS in Japan[J]. J Vet Med Sci, 1994, 56(50): 901-909.

[5] 郭宝清，陈章水，刘文兴. 从疑似 PRRS 流产胎儿分离猪生殖与呼吸综合征病毒的研究[J]. 中国畜禽传染病, 1996, 87(2) :1-5.

[6] Dea S, Wilsion L, Therrien D, *et al*. Competitive ELISA for detection of antibodies to porcine reproductive and respiratory syndrome virus using recombinant *E.coli*-expression nucleocapsid protein as antigen [J]. J Virol Methods, 2000, 87:109-122.

[7] Meulenberg J J M, Petersen-den Besten A, Kluyver E P, *et al*.

维普资讯 http://www.cqvip.c

Characterization of proteins encoded by ORFs 2 to 7 of Lelystad virus [J]. Virology, 1995, 206:155-163.

[8] Pirzadeh 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.

[9] 邱德新, 陈焕春, 万绍贵. 猪繁殖与呼吸综合征病毒核衣壳蛋白基因的克隆与原核表达研究[J]. 中国病毒学, 2003, 18(2):146-151.

[10] 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(第二版)[M], 金冬雁, 黎孟枫, 译. 北京: 科学出版社, 1998, 876-898.

[11] Dea S, Wilson L, Therrien D. Competitive ELISA for detection of antibodies to porcine riproductive and respiratory syndrome virus using recombinant *E.coli*-expressed nucleocapsid protein as antigen [J].J Virol Methods, 2000, 87: 109-122.

[12] Witte SB, Chard-Bergstrom C, Loughin TA, *et al*. Development of a recombinant nucleoprotein-based enzyme-linked immunosorbent assay for quantification of antibodies against porcine reproductive and respiratory syndrome virus[J]. Clin Diagn Lab Immunol. 2000, 7(4): 700-702.

[13] Gonin P, Pirzadeh B, Gagnon C A. Seroneutralization of porcine reproductive and respiratory syndrome virus correlates with antibody response to the GP5 major envelope glycoprotein [J]. J Vet Diagn Invest, 1999, 11: 20-26.

[14] 方六荣, 肖少波, 牛传双, 等. 猪繁殖与呼吸综合征病毒 ORF5 基因在昆虫细胞中的高效融合表达[J]. 微生物学报, 2003, 43 (1): 8-14.

欢迎订阅 2005 年《武汉植物学研究》

《武汉植物学研究》为科学出版社出版、国内外公开发行的植物学综合性学术期刊。主要报道我国植物学及各分支学科的原始研究论文，以及植物学研究的新技术、新方法，酌登专题综合评述和研究简报、重要书刊评介、学术动态等。主要读者对象为从事植物学研究的科技人员、大专院校师生，以及相关学科，包括农、林、牧、医药、轻工、水产和环保等方面的工作者。

本刊为中国科技核心期刊、中国中文核心期刊，被中国科学引文数据库、《中国生物学文摘》、《中国药学文摘》、美国《CA》和中国学术期刊综合评价数据库等作为来源期刊和核心期刊收录，并被中国科技信息所列为《中国科技论文统计与分析》的统计源期刊。曾荣获湖北省优秀科技期刊奖、全国优秀科技期刊奖和中国科学院优秀期刊奖。

本刊为双月刊，大 16 开本，全铜版纸印刷，双月末出版。国内定价 15.00 元，全年 90.00 元。邮发代号 38-103，全国各地邮局均可订阅。如漏订，本刊编辑部可办理邮购。

编辑部地址：武汉市武昌磨山中国科学院武汉植物园内（或武汉市 74006 信箱）；邮政编码：430074；电话：027-87510755；E-mail: editor @ rose. whiob.ac.cn