

# 猪繁殖与呼吸综合征病毒 S1 株 GP3 蛋白的原核表达与纯化\*

蒋文明, 姜平\*\*, 李玉峰

(南京农业大学农业部动物疫病诊断与免疫重点开放实验室, 江苏南京 210095)

## Prokaryotic Expression of the GP3 Protein of Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus S1 Strain

JIANG Wen-ming, JIANG Ping\*\*, LI Yu-feng

(Key Laboratory of Animal Diseases Diagnostic and Immunology, Ministry of Agriculture, College of Veterinary Medicine, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China)

**Abstract:** The GP3 deleted hydrophobic N-terminal sequence (tGP3) of *Porcine reproductive and respiratory syndrome virus* (PRRSV) was cloned into prokaryotic expression vector pRSET. The recombinant protein (His)<sub>6</sub>-GP3 was highly expressed in *E. coli* BL21 and could amount to 41% of the total proteins. It could be purified efficiently with affinity chromatography. Western-blotting analysis showed that the recombinant protein was able to react with PRRSV polyclonal antiserum. It can be used for the further investigation on immunogenicity and function of GP3 of PRRSV.

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

**摘要:** 利用限制性酶切从重组质粒 pRSET-GP3 中得到缺失 N 端疏水序列的基因片段 tGP3 (truncated GP3)。将 tGP3 克隆至原核高效表达载体 pRSET, 在 *E. coli* BL21 细胞中用 IPTG 诱导表达了猪繁殖与呼吸综合征病毒 (PRRSV) 重组蛋白 (His)<sub>6</sub>-GP3, 并用亲和层析法获得了纯化蛋白。Western-Blotting 结果表明重组蛋白可被 PRRSV 阳性血清所识别, 从而为进一步研究 PRRSV GP3 结构蛋白的免疫特性和功能奠定了基础。

**关键词:** 猪繁殖与呼吸综合征病毒; GP3; 原核表达

中图分类号: S852.65 文献标识码: A 文章编号: 1003-5125(2005)05-0519-03

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) 引起的、以怀孕母猪繁殖障碍和仔猪的呼吸道症状为特征的一种传染病<sup>[1]</sup>。本病给世界和我国养猪业造成了巨大的经济损失, 现已成为危害规模化养猪生产的主要疫病之一。国内外学者对 PRRSV 的主要结构蛋白已做了大量研究, 而对次要结构蛋白的研究相对较少。由 ORF3 编码的 GP3 是 PRRSV 的次要结构蛋白, 是一种糖基化蛋白, 在病毒的致病性、病毒复制、病毒装配、病毒变异和保护性反应等方面可能具有重要意义<sup>[2,3]</sup>。Plana 等报道用杆状病毒表达的 ORF3 的基因产物免疫母猪, 对怀孕母猪可以提供 68.4% 的保护

力<sup>[4]</sup>。因此研究和分析该蛋白的免疫特性及其功能具有十分重要的理论意义。本研究采用原核高效表达载体 pRSET 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。

## 1 材料与方法

### 1.1 质粒、载体、菌株及材料

重组质粒 pRSET-GP3, 由本实验室构建并保存。*E. coli* BL21 菌株, 由本实验室保存。表达载体 pRSET, 购自 Invitrogen 公司。限制性内切酶 *Bgl*I 和 *Eco*R, 购自 TaKaRa 公司。ProBond Purification System, 购自 Invitrogen 公司。猪抗 PRRSV 阳性血清由

收稿日期: 2005-03-31, 修回日期: 2005-04-29

\* 基金项目: 国家自然科学基金 30471288, 30270990, 教育部博士点基金项目 2003030712; 新世纪优秀人才支持计划 (NCET-04-0502)

作者简介: 蒋文明 (1979-), 男, 山东诸城籍, 博士研究生, 从事动物传染病防治研究

\*\* 通讯作者. Corresponding author. Tel: 025-84395504, E-mail: jiangp@njau.edu.cn

本实验室制备并保存。

## 1.2 PRRSV S1 tGP3 基因片段的获取

根据 PRRSV NJ-a 序列 (GenBank accession No. A Y738730) 和 ORF3 基因编码氨基酸序列的分析,利用限制性内切酶 *Bgl* 和 *EcoR* 进行酶解,获得符合阅读框的缺失 N 末端疏水区的 tGP3 基因,预期目的基因长度为 570bp。

## 1.3 目的基因的原核重组表达载体的构建和鉴定

利用限制性内切酶 *Bgl* 和 *EcoR* 酶切表达载体质粒 pRSET,将纯化回收后的目的基因产物与表达载体 pRSET 连接,连接物转化大肠杆菌 BL21 感受态细胞。碱裂解法快速提取质粒,用 *Bgl* 和 *EcoR* 进行酶切分析,1%琼脂糖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 pRSET-tGP3 进行序列测定。

## 1.4 基因工程重组表达菌的诱导表达与纯化

挑取阳性重组菌的单菌落,接种于 3mL 2 ×YT (Amp<sup>R</sup>) 培养基中,37℃ 振荡过夜后,1:50 稀释到 2 ×YT(Amp<sup>R</sup>) 中,37℃ 振荡培养至生长晚期 (OD<sub>600</sub> = 1.0),加入终浓度为 0.5mmol/L 的 IPTG,分别于诱导前和诱导后 2h、4h 和 6h 收集菌液,用 12% 聚丙烯酰胺凝胶进行 SDS-PAGE 电泳观察。

细菌大量表达后,纯化方法参考 ProBond Purification System 试剂盒说明书进行。纯化后的蛋白用 10mmol/L Tris(pH8.0) 和 0.01% 的 Triton X-100 于 4℃ 透析。纯化后的蛋白进行 SDS-PAGE 和 Western-Blot 分析。

## 1.5 Western-Blotting

参照 Bio-Rad 公司半干转印仪操作说明进行电转印,然后进行免疫检测。将丽春红染色后的 NC 膜转移至封闭液中,室温轻摇 3~5h 后 4℃ 封闭过夜;倾去封闭液,用洗涤液 PBST 洗膜 3 次,每次 10min,然后加入以封闭液 1:50 稀释的 PRRSV 阳性血清 (PRRSV 阳性血清由本实验室制备),室温下振荡 1.5~2h;再用 PBST 洗膜 3 次,每次 10min,然后加入以封闭液 1:5000 稀释的 SPA-HRP 标记物,室温振荡 1.5~2h;再用 PBST 洗膜 3 次,每次 10min,最后用 SuperSignal West Pico Trial Kit 进行显色,在 X 胶片上曝光、显影和定影观察。

## 2 结果

### 2.1 PRRSV S1 tGP3 基因片段的获取

利用限制性酶切方法从阳性重组质粒 pRSET-GP3 酶切得到缺失 N 末端疏水区的基因片段 tGP3。1.0% 琼脂糖凝胶电泳检查酶切回收产物,

结果表明获得了与预期片段大小相符 (tGP3 为 570bp) 的清晰、单一的条带 (图 1)。

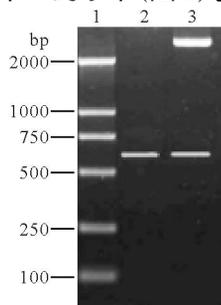


图 1 目的基因的获得与重组质粒的酶切鉴定

Fig. 1 The identification of recombinant plasmids  
1, DL2000 Marker; 2, The purified tGP3 gene; 3, The pRSET-tGP3 digested with *Bgl* and *EcoR*.

### 2.2 原核重组表达质粒的构建和鉴定

表达载体质粒 DNA 用限制性内切酶 *Bgl* 和 *EcoR* 双酶切后与目的基因进行连接和转化,小量抽提重组质粒,经 *Bgl* 和 *EcoR* 酶切得到 2.9kb 的载体 DNA 和相应大小目的片段的重组质粒鉴定为阳性重组表达质粒。电泳结果显示酶切产物中片段的大小与预期结果一致,阳性重组表达质粒命名为 pRSET-tGP3 (图 1)。序列测定结果表明克隆至原核表达载体中的外源片段基因没有发生突变,插入方向和位置与预期结果一致。

### 2.3 基因工程重组菌的诱导表达和 SDS-PAGE 分析

表达产物为带有 6 ×His 的非融合蛋白,因此将重组蛋白命名为 (His)<sub>6</sub>-GP3。用 12% 聚丙烯酰胺凝胶对诱导前和诱导后 2h、4h 和 6h 的样品进行 SDS-PAGE 检查,结果表明重组菌 pRSET-tGP3-BL21 在诱导后出现一条大小约为 20kDa 的蛋白条带,大小与预期的蛋白分子量基本一致。重组蛋白的表达量随诱导时间的延长而增加,诱导后 4h 表达量可达到 41%,用 His 亲和层析柱可获得单一纯化蛋白 (图 2)。

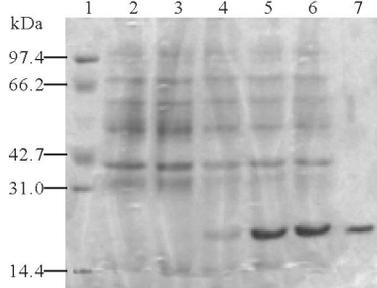


图 2 重组蛋白 (His)<sub>6</sub>-GP3 在 BL21 中的诱导表达动态分析

Fig. 2 The dynamic analysis of expression of the recombinant protein (His)<sub>6</sub>-GP3

1, Protein Marker; 2, BL21; 3, pRSET-tGP3/BL21 pre-induced; 4, pRSET-tGP3/BL21 induced 2h; 5, 4h; 6, 6h; 7, purified (His)<sub>6</sub>-GP3.

## 2.4 重组蛋白的特异性鉴定

用猪源 PRRSV 阳性血清对基因工程重组菌诱导表达产物和宿主菌进行 Western-Blotting 检测。结果显示 (His)<sub>6</sub>-GP3 在大小约 20kDa 处出现一清晰的特异性反应条带,而宿主菌无此条带。表明重组蛋白在大肠杆菌中得到了正确表达并保留了与 PRRSV 阳性血清反应的抗原性(图 3)。

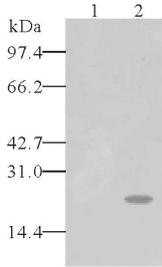


图3 PRRSV 重组蛋白 (His)<sub>6</sub>-GP3 的 Western-Blot 检测

Fig.3 The detection of recombinant (His)<sub>6</sub>-GP3

1, The proteins of BL21; 2, The protein of pRSET-t GP3/BL21 induced by IPTG.

## 3 讨论

我们最初曾尝试在大肠杆菌中表达 S1 株的 ORF3 全长的编码基因,利用原核表达载体 pGEX-6p-1、pET32a、pRSET 等构建了几种不同的原核重组表达质粒,尝试诱导表达,但仅能非常有限地表达目的蛋白或没有表达。一些研究表明去除跨膜区或强疏水序列可明显提高蛋白的表达量,也可明显提高蛋白的溶解性<sup>[5]</sup>。应用分子生物学分析软件对 S1 株 ORF3 基因及其编码产物的氨基酸序列进行分析,在分析基因的酶切位点以及预测蛋白的信号肽序列、跨膜区及其抗原表位等分子特征的基础上,我们切除了 GP3 N 末端的疏水序列,而保留了 C 末端抗原性较强的亲水序列,最终利用原核表达载体 pRSET 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量有较大影响。

由 PRRSV 基因组 ORF3 编码的次要结构蛋白 GP3 是糖基化蛋白,在不同分离株间差异较大,美洲株的 GP3 蛋白在 C 端比欧洲株少 12 个氨基酸,因而使二者的 C 末端性质不同,但是现在还不清楚这种差异是否导致功能上的差异。目前对于 GP3 是否是结构蛋白也存在一定争议。对欧洲型毒株 LV 的研究表明<sup>[6]</sup>,其 GP3 是结构蛋白,而加拿大的 Quebec IAF-Klop 株的 GP3 被认为是可溶性的非结构糖蛋白<sup>[7]</sup>,并认为分泌到细胞外的小量 GP3 蛋白可能是导致 GP3 在感染猪体内具有高免疫能力的一个因素<sup>[8]</sup>。在 ORF3 和 ORF4 重叠处存在一高变区,该区域容易迅速变异,可能是受到免疫选择压

力的结果,在免疫中有可能起重要作用。应用单克隆抗体技术发现 GP3 蛋白中包含有中和表位,可以诱导机体产生中和抗体并能中和病毒,而且针对 GP3 的抗体无抗体依赖性增强作用<sup>[9,10]</sup>。因此深入研究 PRRSV 的 GP3 蛋白的免疫特性及其相应功能具有一定的理论意义和实践意义。本研究在体外成功地表达了 PRRSV 的 GP3 蛋白,为进一步研究其免疫特性、结构和功能奠定了基础。

## 参考文献

- [1] Wensvoort G, Terpstra C, Pol J M, *et al.* Mystery swine disease in The Netherlands: the isolation of Lelystad virus[J]. *Vet Q*, 1991, 13(3): 121-130.
- [2] van Nieuwstadt A P, Meulenber 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] Meulenber J M, Petersen-den Besten A, De Kluyver E P, *et al.* Characterization of proteins encoded by ORFs 2 to 7 of Lelystad virus[J]. *Virology*, 1995, 206: 155-163.
- [4] Plana D 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(1): 19-29.
- [5] 季朝能,白晓阳,盛小禹,等. 信号肽去除的耐热碱性磷酸酯酶 FD-TAP 在大肠杆菌中的亚克隆和高表达[J]. *生物工程学报*, 2000, 16(6): 690-693.
- [6] 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.
- [7] Gonin P, Mardassi H, Gagnon C A, *et al.* A nonstructural and antigenic glycoprotein is encoded by ORF3 of the IAF-Klop strain of porcine reproductive and respiratory syndrome virus [J]. *Arch Virol*, 1998, 143 (10): 1927-1940.
- [8] Mardassi H, Gonin 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 (8): 6298-6306.
- [9] Cancel-Tirado S M, Evans R B, Yoon K J. Monoclonal antibody analysis of Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome virus epitopes associated with antibody-dependent enhancement and neutralization of virus infection [J]. *Vet Immunol Immunopathol*, 2004, 102(3): 249-262.
- [10] Weiland E, Wiczorek-Krohmer M, Kohl D, *et al.* Monoclonal antibodies to the GP5 of porcine reproductive and respiratory syndrome virus are more effective in virus neutralization than monoclonal antibodies to the GP4 [J]. *Vet Microbiol*, 1999, 66(3): 171-186.