

# PRRSV 清道夫受体 CD163 基因的真核表达和功能鉴定

李红<sup>1</sup>, 周恩民<sup>2</sup>, 刘成倩<sup>1</sup>, 易建中<sup>1\*</sup>

(1. 上海市农业科学院畜牧兽医研究所, 上海 201106; 2. 西北农林科技大学动物医学院, 陕西杨凌 712100)

[收稿日期]2013-06-29 [文献标识码]A [文章编号]1002-1280-(2013)10-0010-05 [中图分类号]S852.4

**[摘要]** 从猪肺泡巨噬细胞(PAM)中提取总 RNA 为模板, 采用 RT-PCR 法获得猪繁殖与呼吸综合征病毒(PRRSV)的受体 CD163 全基因, 将该基因克隆到真核表达载体 pcDNA3.1/V5-HIS A 上, 构建出真核重组质粒 pcDNA3.1-CD163, 经酶切和 DNA 测序证明获得了 CD163 基因, 其序列与 GenBank 报道序列比较, 核苷酸同源性为 99.37%。将测序正确的 CD163 基因在脂质体 Lipofectamine™2000 介导下转染 PK-15 细胞, 通过间接免疫荧光(IFA)检测到了 CD163 在 PK-15 中的表达。将转染的细胞感染 PRRSV 后, 经 IFA 检测转染 CD163 的细胞能够被 PRRSV 感染。

**[关键词]** 猪肺泡巨噬细胞; 猪繁殖与呼吸综合征病毒; 清道夫受体; CD163 基因

## The Eukaryotic Expression and Functional Identification of Scavenger Receptor CD163 of PRRSV

LI Hong<sup>1</sup>, ZHOU En-min<sup>2</sup>, LIU Cheng-qian<sup>1</sup>, YI Jian-zhong<sup>1\*</sup>

(1. Animal Huabandry and Veterinary Research Institute, Shanghai Academy of Agricultural Science, Shanghai 201106, China;

2. College of Veterinary Medicine, Northwest A & F University, Yangling, Shaanxi 712100, China)

**Abstract:** Total RNA was extracted from porcine alveolar macrophage (PAM), and then the PRRSV receptor CD163 cDNA was obtained by RT-PCR. The full length CD163 was cloned into pcDNA3.1/V5-HIS A vector, and thus the pcDNA3.1-CD163 vector was constructed. The CD163 gene encoding 1115 amino acids was 3345 bp in length, and homologous comparison showed 99.37% with the sequence reported in GenBank (EU016226). The recombinant plasmid was transfected into PK-15 cells. At 72 h after transfection, the expression of CD163 was confirmed by indirect immunofluorescence assay (IFA) with the monoclonal antibody of anti-CD163. The cells inoculated by PRRSV could be infected by IFA.

**Key words:** PAM; PRRSV; scavenger receptor; CD163

猪繁殖与呼吸综合征 (porcine reproductive and respiratory syndrome, PRRS) 是由猪繁殖与呼吸综合征病毒 (PRRSV) 引起的以母猪繁殖障碍, 仔猪和育成猪呼吸道症状及高死亡率为特征的传染病<sup>[1]</sup>。

PRRSV 感染宿主细胞首先与细胞膜表面的特异性受体结合, 利用细胞的内吞作用感染易感细胞。目前已被公认的 PRRSV 受体是唾液酸粘附素 Sn<sup>[2]</sup>、硫酸乙酰肝素<sup>[3]</sup>、波形蛋白<sup>[4]</sup> 和清道夫受体

基金项目: 上海市科技兴农重点攻关项目 (沪农科攻字 (2007) 第 12-1 号)

作者简介: 李红, 博士, 从事抗病毒药物筛选以及病毒分子生物学研究。

通讯作者: 易建中。E-mail: yijianzhong@yahoo.com

CD163<sup>[5]</sup>。清道夫受体是一种细胞表面的糖蛋白,属于受体超家族。它广泛分布于巨噬细胞、血管平滑肌细胞和内皮细胞等细胞上。CD163是该家族成员之一,其在PRRSV感染宿主细胞中起重要作用。

实验从PAM中扩增出CD163基因,成功构建了CD163的真核表达载体。旨在为下一步研究PRRSV于CD163上结合域以及与其它受体和病毒蛋白之间的相互作用提供基础。

## 1 材料与方法

1.1 细胞、毒株和抗体 PRRSV(12#), BHK-21细胞由本实验室保存。抗PRRSV的阳性血清,由本实验室攻毒PRRSV阴性仔猪获得。

1.2 菌株、载体及试剂 克隆宿主菌 *E. coli* TOP10、表达载体质粒 pcDNA3.1/V5-His A 由本实验室提供; pMD18-T-simple 载体、限制性内切酶 *Bam*H I 和 *Xba*I、T4 DNA 连接酶、AMV 反转录酶、RNase inhibition 均为大连宝生物工程有限公司产品。DNA 纯化试剂盒、质粒提取试剂盒、TransTaqDNA polymerase High Fidelity (HiFi), 北京全式金生物技术有限公司; 鼠抗猪 CD163-FITC 单抗, AbD 公司; QIAGEN QIAprep Spin Miniprep Kit, QIAGEN 公司; 转染试剂 Lipofectamine™ 2000, Trizol, Invitrogen 公司; FITC 标记的兔抗猪 IgG(H+L), 美国 Jackson 公司; 其它常用试剂均为国产分析纯。

1.3 引物设计与合成 根据 GenBank 中登录的 PRRSV 受体 CD163 基因序列, 利用 Primer 5 软件设计了一对特异性扩增引物。上游引物 P-CD-163-F: 5'-CGGGATCCATGGACAACTCAGAATGGTGCTACATGAAACTCT-3'; 下游引物 P-CD163-R: 5'-GCTCTAGATTGTA CTT CAGAGTGTCTCCTGAGGGATT-3'。在其中分别引入 *Bam*H I 和 *Xba*I 酶切位点(加下划线部分)。引物在上海生物工程有限公司合成。

1.4 CD163 基因的获取及测序 根据 GenBank 上公布的猪 CD163 序列(序列号: EU016226), 设计并合成一对用于扩增 CD163 全长基因的引物。参照 Invitrogen 公司的 RNA 提取试剂盒使用说明, 用 Trizol 提取 PAM 细胞的总 RNA, 以下游特异引物和 AMV 进行 cDNA 第一链的合成(总 RNA 1 μg, 10 μM 特异引物 2 μL, 10 mM dNTP 1 μL, 5 × RT Buffer 4 μL, RNase Inhibitor 20 U, AMV RTase 10 U, DEPC 水补充到 20 μL。混匀后轻微离心, 室温放 10 min 置后

转入 42 °C 保温 60 min, 然后冰水中冷却 2 min)。反应合成的 cDNA 进行 PCR。反应体系为 50 μL, 具体成分为 cDNA 0.5 μg, 10 × HiFi Buffer (含 Mg<sup>2+</sup>) 5 μL, 10 mM dNTPs 1 μL, 10 μM 上下游引物各 1 μL, HiFi DNA 聚合酶 2.5 U, ddH<sub>2</sub>O 补齐。扩增程序: 94 °C 5 min, 94 °C 30s, 60 °C 30s, 72 °C 3 min 30 s, 进行 35 循环, 72 °C 10 min。反应结束后, 使用 1.0% 的琼脂糖凝胶电泳检测扩增结果。回收目的 DNA 片段, 连接到 pMD18-T-simple 载体, 阳性质粒送上海生物工程有限公司测序验证正确, 命名为 pMD-T-simple-CD163。

1.5 重组表达质粒的构建、鉴定 将 pMD18-T-simple-CD163 经 *Bam*H I 和 *Xba*I 双酶切之后, 回收约 3345 bp 大小的 DNA 片段。同时用 *Bam*H I 和 *Xba*I 双酶切 pcDNA3.1/V5-His A 真核表达载体, 并回收; 利用 T4 DNA 连接酶将回收的目的 DNA 片段与 pcDNA3.1/V5-His A 进行连接, 连接产物转化于 TOP10 感受态, 采用氨苄抗性筛选获得的质粒经 PCR 鉴定和双酶切鉴定, 鉴定为阳性的质粒送上海生物工程有限公司测序, 测序正确的质粒命名为 pcDNA3.1-CD163。采用质粒提取试剂盒 (Genopure Plasmid) 提取 pcDNA3.1-CD163 质粒, 测定纯化后的质粒的浓度以及 A260 值和 A280 值, 根据 A260/A280 的比值来判断质粒的纯度, 并根据稀释度来计算质粒 DNA 的浓度。-80 °C 保存备用。

1.6 PRRSV 的繁殖 将 Marc-145 细胞过夜培养成单层后, 弃掉上清, 加入种毒 1 mL (病毒量为 5 × 10<sup>6.5</sup> TCID<sub>50</sub>), 于 37 °C 作用 1 h, 加入维持液 (DMEM 基础培养基、3% 胎牛血清及抗生素), 培养 3~4d, 细胞病变达 75% 以上收毒。

1.7 猪肺泡巨噬细胞 PAM 的获得 从 3~4 周龄的 PRRSV 阴性猪肺中提取, 用灭菌的 PBS (0.01 mol/L, pH 7.2) 灌洗肺脏, 用 PBS 洗涤 3 次, 每次 300 r/min 离心 10 min, 收集的 PAM 细胞分装冻存于 -80 °C 备用。

1.8 细胞培养、转染及重组质粒转染检测 PK-15 细胞和 Marc-145 细胞培养于含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养基中, 37 °C, 5% CO<sub>2</sub> 培养箱中培养; 按 Lipofectamine™ 2000 试剂说明: 将 1 × 10<sup>5</sup> 个 PK-15 细胞接种于 24 孔细胞培养板中, 当细胞生长至 95% 融合时, 用 2 μL 脂质体 Lipofectamine™ 2000 介导 2 μg pcDNA3.1/V5-His-CD163 重组质粒转染 PK

-15 细胞,24 h 后观察瞬时表达情况,同时以 pcDNA3.1/V5-His 质粒转染作为阴性对照;将转染 48 h 的细胞,弃掉上清,使用预冷的 75% 乙醇固定细胞,4 °C 放置 30 min,弃掉 75% 乙醇吹干,加入鼠抗猪 CD163 的一抗,37 °C 孵育 1 h 后,使用 PBS (0.01 mol/L, pH 7.2) 洗涤三次,5 min/次,加入羊抗鼠 FITC 标记的二抗,37 °C 孵育 1 h,弃掉, PBS 洗涤三次,每次 5 min。然后加入 ddH<sub>2</sub>O 静置 10 min,吹干,荧光显微镜下观察。

1.9 PRRSV 感染 PK-15 细胞 将转染 24 h 的 PK-15 细胞(转染质粒/对照),弃掉细胞上清,使用 PBS(0.01 mol/L, pH 7.2) 洗涤 2~3 次,将稀释的病毒液(1 × 10<sup>5</sup> TCID<sub>50</sub>/mL) 接入细胞感作 1 h 后,加入 3% 的细胞维持液培养 24 h 后,弃掉上清,使用预冷的 75% 乙醇固定细胞,4 °C 放置 30 min,弃掉 75% 乙醇吹干,加入(150 倍)稀释的 PRRSV 阳性猪血清(预实验测定最佳稀释度),37 °C 孵育 1 h 后,使用 PBS(0.01 mol/L, pH 7.2) 洗涤三次,5 min/次,加入兔抗猪 FITC 标记的二抗,37 °C 孵育 1 h,弃掉, PBS 洗涤三次,每次 5 min; 然后加入 ddH<sub>2</sub>O 静置 10 min,吹干,荧光显微镜下观察。

## 2 结果

2.1 CD163 基因片段的 RT-PCR 扩增 从猪肺泡巨噬细胞中提取总 RNA (图 1), 利用 RT-PCR 扩增技术扩增,取 10 μL PCR 产物与 4 μL 上样缓冲液混合后,在 1% 琼脂糖凝胶上电泳,以 DNA Marker DL5000 为对照,在 3000~5000 bp 之间有一条特异性亮带,与预期的 3345 bp 相符(图 2)。

2.2 pcDNA3.1-CD163 菌落 PCR 酶切鉴定及测序 重组质粒经菌落 PCR 和琼脂糖凝胶电泳检测可见在 3345 bp 处出现目的条带(图 3),与预期产物片段大小一致,挑取菌落 PCR 鉴定出来的单克隆进行培养,提取质粒,经 *Bam*H I 和 *Xba*I 双酶切后的产物经琼脂糖凝胶电泳在 5.5 kb 和 3345 bp 处出现条带,分别与 pcDNA3.1(-) 质粒、CD163 基因片段大小相符(图 4),初步证明 CD163 基因正确插入 pcDNA3.1(-) 质粒中,另外经上海生物工程有限公司 DNA 测序分析,重组质粒 CD163 序列与 NCBI GenBank 中 EU016226 序列同源性为 99.37%,没有移码和终止密码子的出现,进一步证实重组质粒共建成功,并将其命名为 pcDNA3.1-CD163。

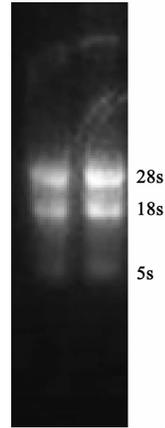
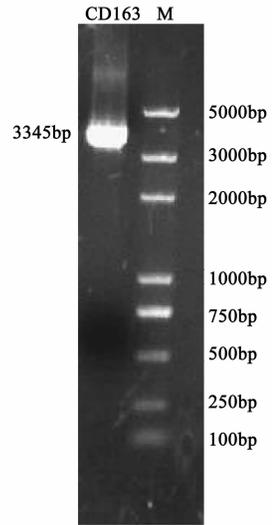
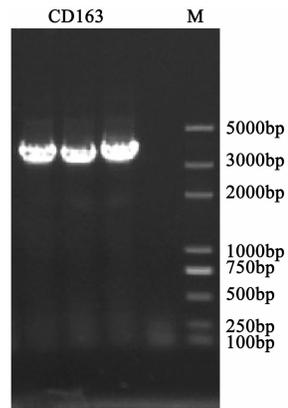


图 1 猪肺泡巨噬细胞总 RNA 检测



M: DNA Marker DL5000

图 2 CD163 基因 PCR 扩增结果



M: DNA Marker DL5000

图 3 pcDNA3.1-CD163 菌落 PCR 鉴定

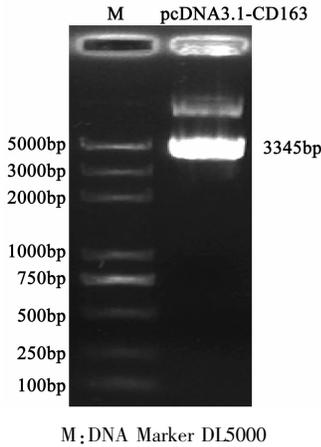
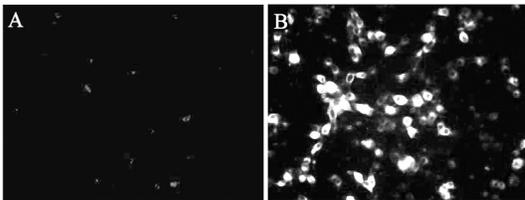


图4 pcDNA3.1 - CD163 双酶切鉴定

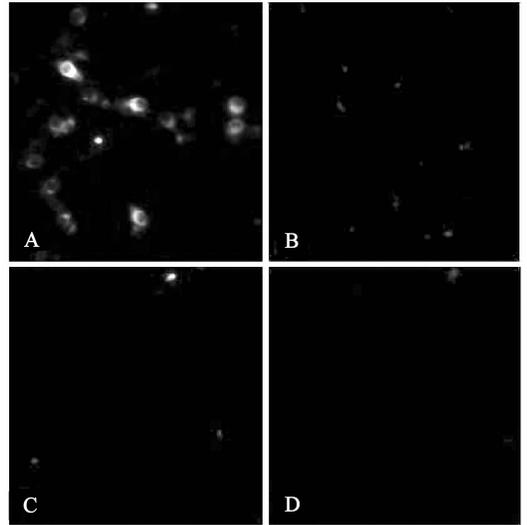
2.3 pcDNA3.1 - CD163 转染 PK - 15 细胞后荧光显微镜观察结果 转染 48 h 后,将细胞固定,经间接免疫荧光实验(图 5)。转染重组质粒 pcDNA3.1 - CD163 的 PK - 15 细胞,在荧光显微镜下观察到有绿色荧光的存在,结果见图 5B;而转染空载体 pcDNA3.1/V5 - HIS A 的 PK - 15 细胞,在荧光显微镜下没有检测到有绿色荧光的 PK - 15 细胞(图 5A)。结果表明,CD163 蛋白在 PK - 15 细胞中获得成功表达。



A:空载体 pcDNA3.1/V5 - HIS A;  
B:重组质粒 pcDNA3.1 - CD163

图5 质粒转染 PK - 15 细胞鉴定(×200)

2.4 pcDNA3.1 - CD163 转染 PK - 15 细胞后感染 PRRSV 后荧光显微镜观察结果 转染 24 h 后,将细胞接入 PRRSV 24 h 后,进行间接免疫荧光实验(图 6)。转染重组质粒 pcDNA3.1 - CD163 的 PK - 15 细胞,在荧光显微镜下观察到有绿色荧光的 PK - 15 细胞,结果见图 6A;转染空载体 pcDNA3.1/V5 - HIS A 的 PK - 15 细胞,在荧光显微镜下没有检测到绿色荧光(图 6C);没有转染质粒(图 6B)和没有感染 PRRSV 的对照细胞(图 6D),在荧光显微镜下也没有绿色荧光。证明 PRRSV 非易感细胞系 PK - 15 细胞转染 CD163 蛋白后,能够被 PRRSV 感染。



A:转染重组质粒 pcDNA3.1 - CD163;B:转染空载体 pcDNA3.1/V5 - HIS A;C:PBS 替代质粒转染;D:PBS 替代质粒转染 PK - 15 细胞未感染 PRRSV

图6 转染 PK - 15 细胞感染 PRRSV 鉴定(×200)

### 3 讨论与结论

据现有报道,目前已经确定在 PAM 细胞上存在着硫酸乙酰肝素(HS),唾液酸粘附素(Sn)和清道夫 CD163 三种 PRRSV 受体。HS 主要吸附病毒粒子,Sn 既吸附病毒又可能通过 CD163 的协助而介导病毒的内吞,CD163 在病毒脱衣壳和将病毒基因组 RNA 释放到细胞质的过程中发挥主要作用<sup>[5-6]</sup>。在 PRRSV 非易感细胞系内转染 CD163 分子可以被 PRRSV 感染并产生子代病毒粒子。为深入研究 CD163 在病毒感染过程中的作用, Van Gorp 等人对 CD163 蛋白结构域进行缺失和嵌合突变,通过感染实验发现, SRCR5 是病毒感染细胞所必需的,而氨基端的四个 SRCR 和胞质尾部是非必需的物质<sup>[7]</sup>。但是, Lee 等人发现 CD163 的胞质尾部能够提高 PRRSV 复制<sup>[8]</sup>。最新研究发现通过基因敲除 Sn 但不影响 CD163 的表达时,并不影响 PRRSV 感染,说明 Sn 并不是促成 PRRSV 感染发病的主要原因<sup>[9]</sup>。PRRSV 受体 CD163 在病毒感染过程中起着非常重要的作用,但是目前研究的还不是很清楚, PRRSV 受体之间到底怎样的互相作用,受体与病毒之间作用位点,虽已有部分报道,但还存在争议。CD163 通过调控血红素与触珠蛋白复合物(Hemoglobin - Haptoglobin complexes, Hb - Hp)的结合来调节机体内部的自我平衡<sup>[10]</sup>。当 Hb - Hp 复合物结合 CD163 分子时可以诱导产生细胞因子。被 PRRSV 感染的猪体内 IL - 1 $\beta$ 、IL - 8、IL - 10、

IL-12、TNF- $\alpha$  等细胞因子的表达水平有所升高,这些细胞因子的上调是否与 CD163 分子有关,目前还未见报道<sup>[11-12]</sup>。

实验从 PAM 细胞中扩增获得猪 CD163 基因,通过间接免疫荧光实验鉴定所表达的 CD163 蛋白可与特异性的 CD163 单克隆抗体发生特异结合,由此证明在 PK-15 细胞中成功表达了 CD163 蛋白;将转染猪 CD163 的 PRRSV 非易感细胞系 PK-15 感作 PRRSV 后,细胞能够被 PRRSV 感染并产生病毒粒子,证明 CD163 是 PRRSV 感染细胞的一个主要的受体。实验为下一步研究 CD163 蛋白在病毒感染过程中的作用以及与病毒结构蛋白、非结构蛋白或其他几个受体之间的关系奠定基础,为深入研究 PRRSV 的感染机制提供理论基础。

**参考文献:**

[1] Rossow K D. Porcine reproductive and respiratory syndrome[J]. Veterinary pathology, 1998,35(1):1-20.

[2] Duan X, Nauwynck H J, Favoreel H W, *et al.* Identification of a putative receptor for porcine reproductive and respiratory syndrome virus on porcine alveolar macrophages[J]. Journal of virology, 1998,72(5):4520-4523.

[3] Delputte P L, Vanderheijden N, Nauwynck H J, *et al.* Involvement of the matrix protein in attachment of porcine reproductive and respiratory syndrome virus to a heparinlike receptor on porcine alveolar macrophages [J]. Journal of virology, 2002, 76(9):4312-4320.

[4] Kim J K, Fahad A M, Shanmukhappa K, *et al.* Defining the cellular target(s) of porcine reproductive and respiratory syndrome virus blocking monoclonal antibody 7G10[J]. Journal of virology, 2006, 80(2):689-696.

[5] Calvert J G, Slade D E, Shields S L, *et al.* CD163 expression confers susceptibility to porcine reproductive and respiratory syn-

drome viruses[J]. Journal of virology, 2007,81(14):7371-7319.

[6] Delputte P L, Costers S, Nauwynck H J. Analysis of porcine reproductive and respiratory syndrome virus attachment and internalization: distinctive roles for heparansulphate and sialoadhesin [J]. The Journal of general virology, 2005, 86(5):1441-1445.

[7] Van Gorp H, Van Breedam W, Van Doorselaere J, *et al.* Identification of the CD163 protein domains involved in infection of the porcine reproductive and respiratory syndrome virus[J]. Journal of virology, 2010,84(6):3101-3105.

[8] Lee Y J, Lee C. Deletion of the cytoplasmic domain of CD163 enhances porcine reproductive and respiratory syndrome virus replication[J]. Archives of virology, 2010,155(8):1319-1323.

[9] Prather R S, Rowland R R, Ewen C, *et al.* An intact sialoadhesin (Sn/SIGLEC1/CD169) is not required for attachment/internalization of the porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV)[J]. Journal of virology, 2013,55-56.

[10] Madsen M, Moller H J, Nielsen M J, *et al.* Molecular characterization of the haptoglobin, hemoglobin receptor CD163. Ligand binding properties of the scavenger receptor cysteine-rich domain region[J]. The Journal of biological chemistry, 2004,279(49):51561-51567.

[11] Chung H K, Chae C. Expression of interleukin-10 and interleukin-12 in piglets experimentally infected with porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) [J]. Journal of comparative pathology, 2003, 129(2):205-212.

[12] Thanawongnuwech R, Thacker B, Halbur P, *et al.* Increased production of proinflammatory cytokines following infection with porcine reproductive and respiratory syndrome virus and Mycoplasma hyopneumoniae[J]. Clinical and diagnostic laboratory immunology, 2004,11(5):901-908.

(责任编辑:陈希)