

doi:10.11751/ISSN.1002-1280.2021.4.02

猪繁殖与呼吸综合征病毒 GP5 蛋白的原核表达及鉴定

秦义娴¹, 刘丹¹, 高金源¹, 周飞燕², 吴华伟^{1*}

(1. 中国兽药药品监察所, 北京 100081; 2. 武汉科前生物股份有限公司, 武汉 430070)

[收稿日期] 2020-12-13 [文献标识码] A [文章编号] 1002-1280 (2021) 04-0011-06 [中图分类号] S852.65

[摘要] 为获得猪繁殖与呼吸综合征病毒 (PRRSV) GP5 蛋白, 以一株 PRRSV NADC30-like 毒株的基因组 RNA 为模板, 利用 RT-PCR 扩增出 ORF5 基因后, 将该基因克隆至原核表达载体 pCold-TF 中, 构建了重组质粒 pCold-TF-GP5, 转化 Rosetta (DE3) 后用 IPTG 诱导, 经 SDS-PAGE、Western blot 鉴定, 重组蛋白获得了可溶性表达, 大小约为 72 ku。将该蛋白过镍柱纯化后获得浓度为 0.5 mg/mL 的纯化蛋白, 为下一步 GP5 蛋白单克隆抗体的制备奠定物质基础。

[关键词] 猪繁殖与呼吸综合征病毒; GP5 蛋白; 原核表达

Prokaryotic Expression and Identification of Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus GP5 Protein

QIN Yi-xian¹, LIU Dan¹, GAO Jin-yuan¹, ZHOU Fei-yan², WU Hua-wei^{1*}

(1. China Institute of Veterinary Drug Control, Beijing 100081, China; 2. Wuhan Keqian Biology Co. Ltd, Wuhan 430070, China)

Corresponding author: WU Hua-wei, E-mail: 314174205@qq.com

Abstract: In order to obtain the GP5 protein of porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV), the ORF5 gene was amplified by RT-PCR using the PRRSV NADC30-like strain genomic RNA as the template. The ORF5 gene was cloned into the prokaryotic expression vector pCold-TF. The recombinant plasmid pCold-TF-GP5 was constructed and transformed into Rosetta (DE3) and induced by IPTG. The SDS-PAGE and Western blot identification indicates the recombinant protein was soluble and its size was about 72 ku. The protein was purified by nickel column with a concentration of 0.5 mg/mL, which laid the material foundation for the preparation of GP5 monoclonal antibody in the next step.

Key words: PRRSV; GP5 protein; prokaryotic expression

基金项目: 中国兽药药品监察所所级课题(201802)

作者简介: 秦义娴, 助理研究员, 从事兽用生物制品的检验和研究工作。

通讯作者: 吴华伟。E-mail: 314174205@qq.com

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)引起的以母猪繁殖障碍和各自龄猪只呼吸道疾病为特征的病毒性传染病^[1]。该病自 1987 年在北美首次报道以来^[2],已蔓延至大部分国家和地区,给全球养猪业造成极大经济损失,我国也不例外。

PRRSV 属于动脉炎病毒科动脉炎病毒属,基因组为不分节段的单股正链 RNA,全长约 15 kb, 包含 10 个开放阅读框(ORFs),其中 ORF5、ORF6 和 ORF7 分别编码病毒的主要结构蛋白 GP5、M 和 N^[3]。GP5 蛋白作为病毒的主要糖基化结构蛋白,具有较好的免疫原性,能够诱导机体产生中和抗体,而且其诱导的抗体中和能力强于 GP4 诱导产生的抗体^[4-5]。GP5 与 M 蛋白可形成 GP5/M 异源二聚体,对病毒装配起重要作用,并介导病毒吸附宿主细胞过程^[6-7]。此外 GP5 蛋白又是 PRRSV 变异最大的结构蛋白,基因 1 型与 2 型间 GP5 的氨基酸序列相似性为 52%~57%,同型毒株间氨基酸序列相似性为 88%~99%^[8-9]。这些都使得 GP5 蛋白成为发展新型疫苗和诊断试剂的良好候选蛋白。本研究以原核表达系统成功表达了 NADC30-like 毒株 PRRSV 46D 的 GP5 蛋白,并对其进行鉴定与纯化,以期为进一步 GP5 单克隆抗体的制备奠定物质基础。

1 材料与方 法

1.1 细胞、毒株、表达载体 Marc-145 细胞、PRRSV 46D(NADC30-like 毒株)、pCold-TF 表达载体,均由中国兽药药品监察所保存。

1.2 主要试剂 Rossetta(DE3)、Top10 感受态细胞购于博迈德生物;病毒 RNA 提取试剂盒,质粒小提试剂盒购于北京天根生物公司;BamH I、Hind III、T4 DNA 连接酶、KOD 酶高保真 PCR 试剂盒、反转录试剂盒、DNA Marker、Protein Marker 购于 TaKaRa 公司;DNA 纯化回收试剂盒购于北京百泰克生物技术有限公司;pEasy-Blunt Simple Cloning Kit 购于北京全式金公司;SDS-PAGE 凝胶制备试剂盒购于碧云天生物技术有限公司;PRRSV 阳性

血清由实验室保存;HRP 标记的兔抗猪 IgG 为 Sigma 公司产品。

1.3 ORF5 基因原核表达载体的构建及表达

1.3.1 引物的设计与合成 根据 GenBank 上发表的 PRRSV NADC30-like 毒株序列设计一对针对 ORF5 基因的特异性引物,上游引物 ORF5-F 为 5'-ATGTTGGGGAAGTGCCTTGAC-3',下游引物 ORF5-R 为 5'-CTAGAGATGACCCATCGTT-3',预期扩增长度为 603 bp。在上下游引物上分别添加 BamH I 和 Hind III 酶切位点,即 5'-CGG-GATCCATGTTGGGGAAGTGCCTTGAC-3'和 5'-CCAAGCTTCTAGAGATGACCCATCGTT-3',引物由北京六合华大基因科技股份有限公司(后简称华大基因)合成。

1.3.2 ORF5 基因的克隆及序列测定 按照病毒 RNA 提取试剂盒说明书提取 PRRSV 46D 毒株的 RNA,反转录为 cDNA,再以 KOD 高保真酶进行 PCR 扩增,回收目的片段后与 pEasy-Blunt Cloning 载体连接,转化入 Top10 感受态细胞,挑取菌落于 2 mL LB 培养液中 37 °C 振荡培养 16 h,进行 PCR 鉴定,取鉴定正确的菌液送华大基因测序。将测序正确的菌液保菌并提取质粒,质粒命名为 pEasy-Blunt-GP5。

1.3.3 重组质粒的构建 以 pEasy-Blunt-GP5 质粒为模板,应用含酶切位点的引物和 KOD 高保真酶进行 PCR 扩增,回收含酶切位点的目的片段。与 pCold-TF 原核表达载体同时进行 BamH I/Hind III 双酶切,回收后进行连接,连接体系为:载体 2 μL,目的片段 6 μL,10 × T4 Buffer 1 μL,T4 DNA 连接酶 1 μL。16 °C,连接 1 h。转化,挑取菌落,于 5 mL LB 培养液中 37 °C 振荡培养 16 h,小提质粒,将质粒命名为 pCold-TF-GP5。将重组质粒按照下述体系进行双酶切:质粒 3 μL,10 × Cusamart Buffer 1 μL,BamH I/Hind III 各 0.5 μL,ddH₂O 5 μL。1% 琼脂糖凝胶电泳鉴定,将鉴定正确的质粒送华大基因测序。

1.3.4 重组质粒的诱导表达 将测序正确的重组质粒 0.5 μL 转化 100 μL Rosetta DE3 感受态细胞,

挑菌于 2 mL 含 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ Amp 的 LB 培养液中 37 $^{\circ}\text{C}$ 振荡培养 12 h, 获得种子菌。按 1:100 (V/V) 接种于 3 mL LB 培养液中, 37 $^{\circ}\text{C}$, 200 r/min 培养。培养至 OD = 0.6, 加入 IPTG (1 mmol/L) 诱导, 37 $^{\circ}\text{C}$, 200 r/min 培养 4 h。

1.4 PRRSV GP5 重组蛋白的鉴定

1.4.1 SDS-PAGE 取 1 mL 诱导的菌液, 12000 r/min, 离心 2 min, 弃上清, 沉淀用 100 μL PBS (1/15 mol/L, pH7.2) 吹散, 加入 25 μL 5 \times SDS-PAGE 上样缓冲液, 煮沸 10 min, 12000 r/min 离心 2 min, 取上清进行 SDS-PAGE 检测, 同时设置空载体对照及未诱导对照。

1.4.2 Western blot 按 1.4.1 方法进行 SDS-PAGE 后, 转印至 0.45 μm PVDF 膜, PBST 洗涤 3 次, 加入 5% W/V PBST 脱脂牛奶室温封闭 1 h。加入 1:100 稀释的 PRRSV 阳性血清室温孵育 1 h。PBST 洗涤 5 次。加入 1:10000 稀释的 HRP 标记的兔抗猪 IgG 室温孵育 1 h。PBST 洗涤 5 次。依照 DAB 显色试剂盒操作说明, 进行避光显色, 流水终止显色。

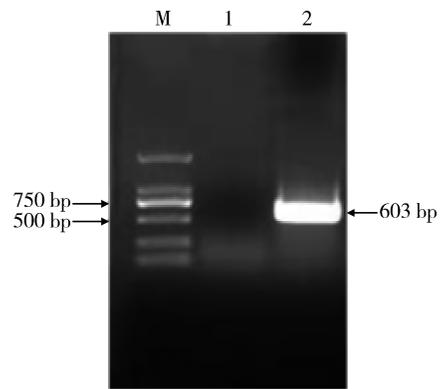
1.5 重组蛋白的大量表达及表达形式的检测 接 2 μL 活化的菌液到 20 mL LB 液体培养基中, 200 r/min 37 $^{\circ}\text{C}$ 培养。将培养的菌液转接到 1000 mL LB 液体培养基中, 200 r/min 37 $^{\circ}\text{C}$ 培养至 OD = 0.6, IPTG (0.5 mmol/L) 16 $^{\circ}\text{C}$ 诱导过夜。6000 r/min, 离心 5 min, 弃上清。菌体用 30 mL 10 mmol/L Tris-HCl (pH8.0) 溶液吹散, 超声波破碎 (500 W, 60 次, 每次 10 s, 间隔 15 s)。取 100 μL 超声后的菌悬液, 12000 r/min 离心 10 min, 取 50 μL 上清至另一 EP 管, 上清去除干净后沉淀用 50 μL 10 mmol/L Tris-HCl (pH8.0) 溶液吹散。SDS-PAGE 电泳检测表达形式。

1.6 重组蛋白的纯化 用去离子水洗镍柱, 至 pH7.0。挂镍, 至 pH 2~3。用去离子水洗柱至 pH7.0。用 100 mL 10 mmol/L Tris-HCl (pH8.0) 溶液平衡镍柱。用 50 mL 含 0.5 mol/L 氯化钠的 10 mmol/L Tris-HCl (pH8.0) 8 mol/L 尿素的溶液平衡镍柱。稀释样品, 使样品含氯化钠终浓度为 0.5 mol/L, 上样。上样结束后, 用含 0.5 mol/L 氯

化钠的 10 mmol/L Tris-HCl (pH8.0) 溶液洗柱。分别用含 15 mmol/L 咪唑、60 mmol/L 咪唑、300 mmol/L 咪唑的 10 mmol/L Tris-HCl (pH8.0, 含 0.5 mol/L 氯化钠) 溶液洗脱, 分别收集蛋白峰。SDS-PAGE 电泳检测蛋白纯化效果。

2 结果与分析

2.1 ORF5 基因的扩增、克隆及序列测定 应用设计的特异性引物 ORF5-F 和 ORF5-R 对 PRRSV 46D 毒株进行 PCR 扩增, 得到一条长度约为 603 bp 的目的条带 (图 1), 与预期片段大小一致。将目的片段克隆至 pEasy-Blunt Cloning 载体后测序得到该基因的正确序列。



M. DNA 标准 DL2000; 1. 阴性对照; 2. PCR 产物

M. DNA Marker DL 2000; 1. Negative control; 2. PCR products

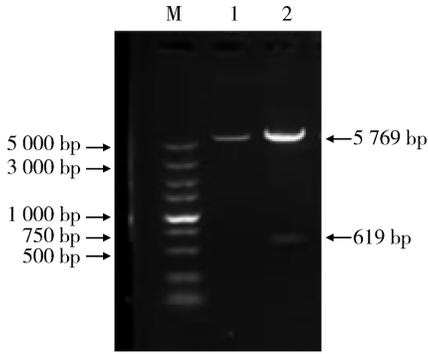
图 1 PRRSV ORF5 基因的 PCR 扩增

Fig 1 PCR amplification of PRRSV ORF5 gene

2.2 重组质粒 pCold-TF-GP5 的双酶切鉴定 对构建的重组质粒 pCold-TF-GP5 进行双酶切鉴定。结果显示, 大小 5769 bp 左右的条带为切开的载体片段, 大小 619 bp 左右的条带是目的片段 (图 2)。

2.3 pCold-TF-GP5 重组蛋白的 SDS-PAGE 分析 取 1 mL 诱导表达的菌液进行 SDS-PAGE, 结果在 72 ku 处可见表达条带, 与预期蛋白大小一致 (图 3)。

2.4 pCold-TF-GP5 重组蛋白的 Western blot 分析 DAB 显色后, 在 72 ku 处有特异性条带, 而空载体对照无此特异性反应。证明构建的重组质粒在大肠杆菌表达系统中能够准确表达 (图 4)。



M. DNA 标准 DL5000; 1. pCold - TF 空载体;
2. pCold - TF - GP5 重组质粒
M. DNA Marker DL 2000; 1. pCold - TF control;
2. pCold - TF - GP5 recombinant plasmid

图 2 重组质粒 pCold - TF - GP5 的双酶切鉴定

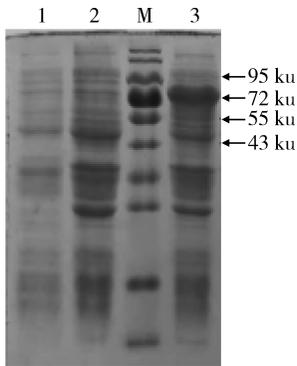
Fig 2 Identification of recombinant plasmid pCold - TF - GP5 by double enzyme digestion



M. 蛋白分子质量标准; 1. pCold - TF 空载体;
2. pCold - TF - GP5 诱导
M. Protein molecular weight Marker;
1. pCold - TF control; 2. pCold - TF - GP5 induced

图 4 pCold - TF - GP5 重组蛋白的 Western blot 鉴定

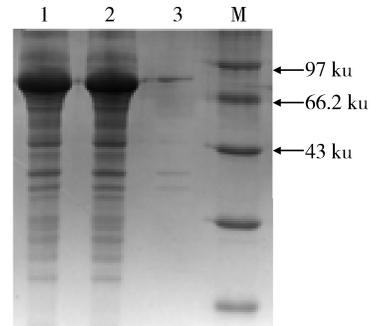
Fig 4 Western blot identification of pCold - TF - GP5 recombinant proteins



M. 蛋白分子质量标准; 1. pCold - TF 空载体;
2. pCold - TF - GP5 未诱导; 3. pCold - TF - GP5 诱导
M. Protein molecular weight Marker; 1. pCold - TF control;
2. pCold - TF - GP5 no induced; 3. pCold - TF - GP5 induced.

图 3 pCold - TF - GP5 重组蛋白的 SDS - PAGE 鉴定

Fig 3 SDS - PAGE identification of pCold - TF - GP5 recombinant proteins



M. 蛋白分子质量标准; 1. 超声后全菌;
2. 超声后上清; 3. 超声后沉淀
M. Protein molecular weight Marker; 1. Total bacteria after ultrasound;
2. Ultrasound supernatant; 3. Precipitation after ultrasound

图 5 pCold - TF - GP5 重组蛋白表达形式的 SDA - PAGE 检测

Fig 5 Detection of expression of pCold - TF - GP5 recombinant protein by SDS - PAGE

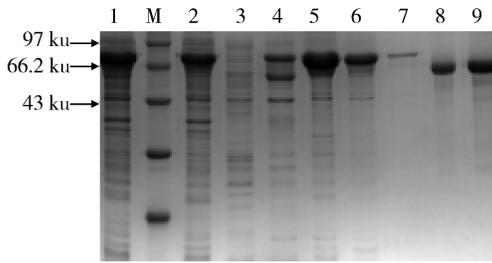
2.5 pCold - TF - GP5 重组蛋白表达形式的检测
超声裂解诱导后的菌液, 将菌液上清和沉淀分别进行 SDS - PAGE 电泳, 表达的 GP5 蛋白主要出现在上清中, 提示该蛋白在上清中表达(图 5)。

2.6 pCold - TF - GP5 重组蛋白的纯化 将表达蛋白挂镍柱后用不同浓度的咪唑(15 mmol/L、60 mmol/L、300 mmol/L)洗脱, 分别收集蛋白峰, 进

行 SDS - PAGE 电泳检测, 结果显示咪唑洗脱的最佳浓度为 300 mmol/L。最终获得纯度较高的 GP5 重组蛋白, 浓度为 0.5 mg/mL(图 6)。

3 讨论与结论

自 1996 年由郭宝清等首次从我国疑似 PRRS 病例中分离到 PRRSV 以来^[10], 该病已在我国存在二十余年, 成为影响我国养猪业发展的重要疾病之



M: 蛋白分子质量标准; 1. 蛋白原样; 2: 流穿;

3: 15 mmol/L 咪唑洗脱; 4: 60 mmol/L 咪唑洗脱;

5 - 7: 300 mmol/L 咪唑洗脱; 8: 0.5 mg/mL BSA; 9: 1 mg/mL BSA

M: Protein molecular weight Marker; 1: Original protein;

2: Flow through; 3: 15 mmol/L imidazole elution;

4: 60 mmol/L imidazole elution; 5 - 7: 300 mmol/L imidazole elution;

8: 0.5 mg/mL BSA; 9: 1 mg/mL BSA

图 6 pCold - TF - GP5 重组蛋白的纯化

Fig 6 Purification of pCold - TF - GP5 recombinant protein

一,特别是 2006 年高致病性猪繁殖与呼吸综合征的出现及 2013 年以来 NADC30 - like 毒株在我国的逐步流行,使得 PRRSV 流行形势越来越复杂,这些都给我国养猪业带来前所未有的挑战。目前,预防 PRRS 主要的疫苗是弱毒苗和灭活苗,两种疫苗各有优缺点,保护效果有限,越来越多的学者试图研究新型基因工程疫苗,而 GP5 蛋白因其良好的免疫原性及较强的中和活性,已成为优秀的候选蛋白。

表达 GP5 蛋白常采用原核表达和真核表达两种方式,白晶等^[11]扩增出 ORF5 基因后将其克隆至真核表达载体 pCI - neo 并转染 Marc - 145 细胞,成功表达出目的蛋白;李志杰等^[12]则将 ORF5 基因克隆至 pCDNA3.1 (+) 真核表达载体,转染 BHK - 21 细胞后获得目的蛋白的正确表达。相比于真核表达,原核表达具有操作简单、经济快捷、应用范围广等优点,且经原核表达的 GP5 蛋白仍具有免疫原性。因 GP5 蛋白含有 31 个氨基酸信号肽和 3 个跨膜功能区^[13],如果将 ORF5 基因全长克隆至原核表达载体,蛋白表达难度较大,故目前的研究中,原核表达时构建 GP5 重组质粒的策略通常是将信号肽删除或将部分跨膜区去掉^[14 - 15],但这样可能会对表达蛋白的抗原性产生影响,也不利于抗原表位的

鉴定。本研究以 pCold - TF 为载体,转化 Rosetta (DE3) 表达菌,充分利用了 pCold - TF 作为冷休克载体可高效可溶性表达其他系统中难以表达蛋白的优点及 Rosetta (DE3) 可提供稀有密码子的特点,成功获得了表达 PRRSV ORF5 基因全长的可溶性蛋白,为下一步制备针对 GP5 蛋白的单克隆抗体提供了物质保障。

参考文献:

- [1] Rossow K D. Porcine reproductive and respiratory syndrome [J]. *Veterinary Pathology*, 1998, 35(1): 1 - 20.
- [2] Keffaber K K. Reproductive failure of unknown etiology [J]. *ASSP Newsletter*, 1989(1): 1 - 9.
- [3] Meulenberg J J, 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 - 63.
- [4] Thaa B, Sinhadri B C, Tieleesch C, *et al.* Signal peptide cleavage from GP5 of PRRSV: A minor fraction of molecules retains the decoy epitope, a presumed molecular cause for viral persistence [J]. *PLoS One*, 2013, 8(6): e65548.
- [5] 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]. *Veterinary Microbiol*, 1999, 66(3): 171 - 186.
- [6] Verheije M H, Welting T J, Jansen H T, *et al.* Chimeric arteri-viruses generated by swapping of the M protein ectodomain rule out a role of this domain in viral targeting [J]. *Virology*, 2002, 303(2): 364 - 373.
- [7] 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]. *J Virol*, 2002, 76(9): 4312 - 4320.
- [8] 杨汉春, 周磊. 猪繁殖与呼吸综合征病毒的遗传变异与演化 [J]. *生命科学*, 2016, 28(3): 325 - 336.
Yang H C, Zhou L. Genetic variation and evolution of porcine reproductive and respiratory syndrome virus [J]. *Chineses Bulletin of Life Sciences*, 2016, 28(3): 325 - 336.
- [9] Pirzadeh B, Gagnon CA, Dea S. Genomic and antigenic variations of porcine reproductive and respiratory syndrome virus major envelope GP5 glycoprotein [J]. *Can J Vet Res*, 1998, 62: 170 - 177.

- [10] 郭宝清, 陈章水, 刘文兴, 等. 从疑似 PRRS 流产胎儿分离 PRRSV 的研究[J]. 中国畜禽传染病, 1996(2): 1-5.
Guo B Q, Chen Z S, Liu W X, *et al.* Isolation of PRRSV from fetus suspected of PRRS abortion[J]. Chinese Journal of Animal Infectious Diseases, 1996(2): 1-5.
- [11] 白晶, 剡根强, 丁壮, 等. PRRSV JL/07/SW 毒株 GP5 基因克隆与真核表达[J]. 中国兽医学报, 2010, 30(5): 569-572.
Bai J, Yan G Q, Ding Z, *et al.* Cloning and eukaryotic expression of GP5 Gene of PRRSV JL/07/SW strain[J]. Chinese of Journal of Veterinary Science, 2010, 30(5): 569-572.
- [12] 李志杰, 提金凤, 李舫, 等. 猪繁殖与呼吸综合征病毒 GP5 蛋白单克隆抗体的制备及鉴定[J]. 动物医学进展, 2016, 37(11): 36-42.
Li Z J, Ti J F, Li F, *et al.* Preparation and identification of monoclonal antibodies against GP5 protein of porcine reproductive and respiratory syndrome virus [J]. Progress In Veterinary Medicine, 2016, 37(11): 36-42.
- [13] Wang Y, Address K J, Chen J, *et al.* MMDB: annotating protein sequences with Entrez's 3D-structure database[J]. Nucleic Acids Res, 2007(35): 298-300.
- [14] 李建辉, 左玉柱, 孙彦欣, 等. 猪繁殖与呼吸综合征病毒 GP5 基因的亚克隆及原核表达[J]. 动物医学进展, 2012, 33(1): 19-22.
Li J H, Zuo Y Z, Sun Y X, *et al.* Subcloning and prokaryotic expression of porcine reproductive and respiratory syndrome virus GP5 Gene[J]. Progress In Veterinary Medicine, 2012, 33(1): 19-22.
- [15] 黄晓静, 李睿, 乔松林, 等. 猪繁殖与呼吸综合征病毒 GP5 蛋白单抗的制备与鉴定[J]. 中国兽医科学, 2019(11): 1374-1382.
Huang X J, Li R, Qiao S L, *et al.* Preparation and identification of monoclonal antibody against GP5 protein of porcine reproductive and respiratory syndrome virus [J]. Chinese Veterinary Science, 2019(11): 1374-1382.

(编辑:李文平)