

PRRSV BJ-4 株 ORF5 基因的原核表达与重组蛋白的纯化

谷 红, 杨汉春*, 郭 鑫, 陈艳红

(中国农业大学农业部预防兽医学重点开放实验室, 北京 100094)

摘 要: 为成功表达猪繁殖与综合征病毒(PRRSV) 结构蛋白 GP5, 通过 PCR 方法从重组质粒 pGEM-ORF5 扩增得到缺失 N 端疏水序列的基因片段 dORF5(deleting ORF5)。将 dORF5 克隆至原核高效表达载体 pGEX-4T-2, 在 *E. coli* BL21 细胞中成功表达了重组蛋白 GST-dORF5, 表达产物以包涵体的形式存在, 表达量为 20.8%。Western Blot 结果表明重组蛋白可被 PRRSV 阳性血清所识别。利用融合肽进行亲和层析得到高纯度的重组蛋白, 为进一步研究 PRRS 病毒结构蛋白的结构和功能奠定了基础。

关键词: 猪繁殖与呼吸综合征; ORF5 基因; 原核表达; 纯化

中图分类号: S852.65

文献标识码: A

文章编号: 0366-6964(2004)01-0064-06

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(Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus, PRRSV)引起的一种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^[1,2,3]。本病 1987 年首先暴发于美国^[4], 引发了一场空前的“流产风暴”, 给世界养猪业造成了灾难性的经济损失。我国自 1995 年底暴发此病, 现已蔓延至我国许多省份, 成为规模化养猪场的主要疫病之一^[5,6,7]。PRRSV 的主要结构蛋白 GP5 是由 ORF5 编码的糖基化囊膜蛋白, 具有较好的免疫原性, 能够诱导产生中和抗体, 且中和抗体出现之后, 抗血清主要识别 GP5 蛋白。GP5 蛋白具有诱导细胞凋亡的活性, 此外, 有研究表明 GP5 蛋白有可能参与病毒粒子结合病毒受体的过程^[8,9]。因此 GP5 蛋白在 PRRSV 的致病性、诊断、预防与控制等方面具有重要意义, 进一步研究和探讨 GP5 蛋白的本质和功能, 将为 PRRS 的防制提供理论依据。本研究采用原核高效表达载体 pGEX-4T-2 在 *E. coli* BL21 细胞中表达了 PRRSV 的 GP5 蛋白, 并对重组蛋白进行了纯化, 为深入研究 GP5 蛋白的结构与功能奠定了基础。

1 材料与方法

1.1 材料

PRRSV BJ-4: 自北京地区某猪场分离和保存^[7]。阳性重组质粒 pGEM-ORF5: 由本实验室构建并保存。PRRSV 阳性血清: 用 PRRSV BJ-4 人工感染 SPF 猪制备。表达载体 pGEX-4T-2 *E. coli* BL21 菌株和 Bulk GST Purification Modules: 购自 Amersham Pharmacia Biotech 公司。Pfu DNA 聚合酶: 购自 Sangon 公司。限制性内切酶 EcoR I 和 BamH I: 购自 Promega 公司。

1.2 方法

1.2.1 PRRSV BJ-4 dORF5 基因片段的扩增 根据 PRRSV BJ-4 序列(Genbank accession No. AF331831)^[10], 采用 Oligo 4.0 软件, 设计合成如下特异性引物(斜体表示引入的酶切位点 EcoR I 和 BamH I):

P5S': 5' TATC *GGATCC*TTCTGTTTTGCT' 3'

P5R': 5' A *GAATTC*CAGAAGTCATTTAAG 3'

以 P5S' 和 P5R' 为上下游引物扩增 dORF5, 94 °C 变性 1 min, 53.8 °C 退火 1 min, 72 °C 延伸 70 s, 共 30 个循环, 最后 72 °C 延伸 5 min。预期扩增产物长度为 564 bp(ORF5 中核苷酸 57-603)。

1.2.2 目的基因的原核重组表达载体的构建和鉴定^[11] 利用限制性内切酶 EcoR I 和 BamH I 分别对目的基因 PCR 产物和表达体质粒 pGEX-4T-2 进行酶解, 将纯化回收后的 PCR 产物与表达载体 pGEX-4T-2 连接, 连接物转化大肠杆菌 BL21 感受

收稿日期: 2003-01-06

基金项目: 霍英东青年教师基金(71032)

作者简介: 谷 红(1972-), 女, 辽宁人, 博士, 主要从事分子病毒学和免疫学的研究。

* 通讯作者, E-mail: yhanchun@mail.cau.edu.cn

态细胞。碱裂解法快速提取质粒,用 EcoR I 和 BamH I 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 pGEX-dORF5 进行测序鉴定。

1.2.3 基因工程重组表达菌的诱导表达 挑取阳性重组菌的单菌落,接种于 3 ml Amp/2XYT 培养基中,37 °C 活化过夜后,1:100 稀释到 Amp/2XYT 中,37 °C 振荡培养至对数生长期($OD_{600} = 0.6$),加入终浓度为 0.1 mmol/L 的 IPTG,于 28 °C 振荡诱导培养 6~8 h。分别于诱导前和诱导后 1,2,4,6 h 收集菌体,用 12% 的聚丙烯酰胺凝胶进行 SDS-PAGE 检查。

1.2.4 Western-Blot 免疫印迹 参照分子克隆实验指南^[1]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 3~5 h 后 4 °C 封闭过夜;倾去封闭液,用洗涤液 PBS-T 洗膜 3 次,每次 10 min,然后加入一抗溶液(以封闭液 1:40 稀释的猪 PRRSV 阳性血清),室温下振荡 1.5~2 h;再 PBS-T 洗膜 3 次,每次 10 min,然后加入二抗溶液(以封闭液 1:400 稀释的 HRP-兔抗猪 IgG 酶标抗体),室温振荡 1.5~2 h;再 PBS-T 洗膜 3 次,每次 10 min,最后置于底物溶液中显色,条带清晰后迅速用蒸馏水终止显色反应。

1.2.5 包涵体的分离与纯化

1.2.5.1 制备包涵体 按最佳诱导表达条件诱导表达基因工程重组菌 400 mL,离心收集诱导表达的菌体并称取菌体湿重克数。每克湿菌加入 3 mL 菌体裂解液(1X PBS,1 mmol/L EDTA (pH 8.0) 悬浮菌体,加入溶菌酶(终浓度为 100 ug/mL),混匀后冰浴 10 min,-20 °C 冻存备用或直接在冰浴中进行超声破菌,每次超声 30 s,间隔 30 s,共超声 12~20 次(裂解次数根据菌体浓度和体积来确定)。或者采用冻融法于 -80 °C 和 37 °C 反复冻溶 10 次,加入 DNase I (终浓度为 10 ug/mL),作用至菌液不再粘稠。

1.2.5.2 包涵体的洗涤 依次用包涵体洗涤液 I (50 mmol/L Tris-Cl,100 mmol/L NaCl,10 mmol/L EDTA,0.5% (v/v) TritonX-100, pH8.0)、包涵体洗涤液 II (50 mmol/L Tris-Cl,100 mmol/L NaCl,10 mmol/L EDTA,0.5% (v/v) TritonX-100,2 mol/L 尿素, pH8.0) 和包涵体洗涤液 III (50 mmol/L Tris-Cl,100 mmol/L NaCl,10 mmol/L EDTA,0.5% (v/v) TritonX-100,4 mol/L 尿素, pH9.0) 洗涤包涵体

沉淀,每次洗涤室温作用 5~10 min,然后 4 °C 下 10 000 r/min 离心 20 min,分别收集上清与沉淀。

1.2.5.3 包涵体的溶解 用包涵体溶解液(50 mmol/L Tris-Cl,100 mmol/L NaCl,1 mmol/L EDTA,0.5% (v/v) TritonX-100,8 mol/L 尿素,5 mmol/L DTT, pH9.0~10) 溶解包涵体沉淀,室温作用 1~2 h,其间不断振荡。4 °C 12 500 r/min 离心 20 min,分别收集上清与沉淀。

1.2.6 包涵体的复性 将溶解的上清装入已处理的透析袋内,置于复性缓冲液中(1X PBS,1 mmol/L EDTA,尿素, pH8.0) 在 4 °C 下进行梯度透析,复性缓冲液中尿素浓度依次递减 4.5 mol/L,3.5 mol/L,2.5 mol/L,1.5 mol/L,0.5 mol/L 和 0 mol/L,换液间隔时间为 10~12 h。

1.2.7 亲和层析纯化目的蛋白 取约含 10 mg 复性的融合蛋白溶液,加入 1 mL 已用 PBS 平衡的 50% Glutathione Sepharose 4B,室温孵育 30~60 min 或 4 °C 过夜,其间不断地轻轻搅拌;500 g 离心 5 min 沉淀介质,小心地弃去上清,加入 10 倍柱床体积的 PBS 进行洗涤,500 g 离心 5 min,小心地弃去上清,再重复洗涤 2 次,洗涤至 A_{280} 小于 0.02;最后用洗脱液(50 mmol/L Tris-Cl,10 mmol/L 还原型谷胱甘肽, pH8.0) 洗脱融合蛋白,每毫升柱体积加入 1 mL 洗脱液,室温孵育 15 min 或 4 °C 过夜,然后 500 g 离心 5 min,小心吸取上清并保留之,再重复洗脱与收集 2~3 次。

2 结果与分析

2.1 PRRSV BJ-4 dORF5 基因片段的扩增 利用 PCR 方法从阳性重组质粒 pGEM-ORF5 扩增得到缺失 N 末端疏水区的基因片段 dORF5。1.0% 琼脂糖凝胶电泳检查扩增的 PCR 产物,结果表明获得了与预期片段大小相符(dORF5 为 564bp)的清晰、单一的扩增条带(见图 1)。

2.2 原核重组表达质粒的构建和鉴定 目的基因的 PCR 产物与表达载体质粒 DNA 分别用限制性内切酶 EcoR I 和 BamH I 双酶切后进行连接和转化,小量抽提重组质粒,经 EcoR I 和 BamH I 酶切得到 4.9 kb 的载体 DNA 和相应大小目的片段(dORF5 大小为 564 bp)的重组质粒均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,说明得到阳性重组表达质粒,命名为 pGEX-dORF5(图略)。序列测序结果也表明克隆至

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。

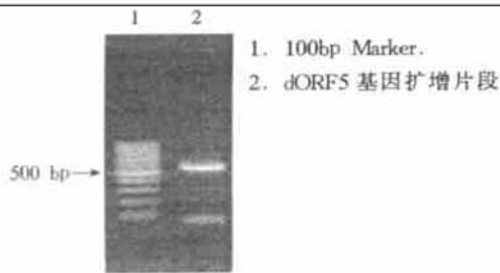
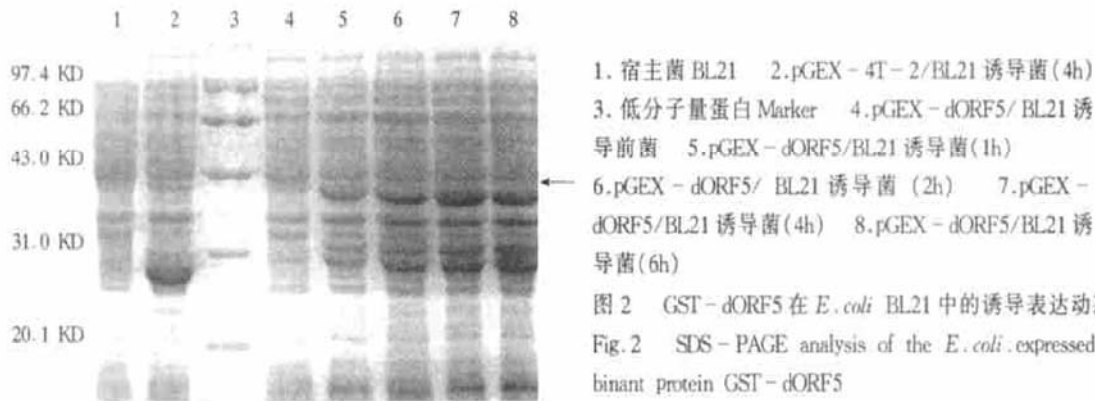


图1 PRRSV BJ-4 dORF5 基因片段的扩增产物
Fig.1 The PCR products of gene segment dORF5 of PRRS virus BJ-4



1. 宿主菌 BL21 2. pGEX-4T-2/BL21 诱导菌(4h)
3. 低分子量蛋白 Marker 4. pGEX-dORF5/BL21 诱导前菌
5. pGEX-dORF5/BL21 诱导菌(1h)
6. pGEX-dORF5/BL21 诱导菌(2h) 7. pGEX-dORF5/BL21 诱导菌(4h)
8. pGEX-dORF5/BL21 诱导菌(6h)

图2 GST-dORF5 在 *E. coli* BL21 中的诱导表达动态分析
Fig.2 SDS-PAGE analysis of the *E. coli* expressed recombinant protein GST-dORF5

体诱导菌以及宿主菌进行 Western Blot 检测。结果显示 GST-dORF5 在大小约 41.5 KD 处出现一清晰的特异性反应条带,而阴性对照菌和空载体诱导菌

无此条带。表明重组蛋白可被 PRRSV 阳性血清所识别。此外,31-32 KD 左右的蛋白带也呈特异性阳性反应,可能是 GST-dORF5 降解产物(见图 3)。

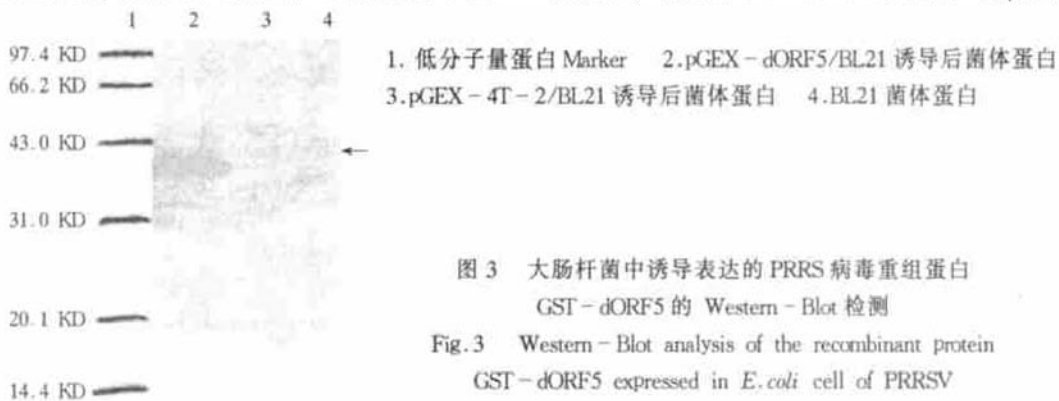


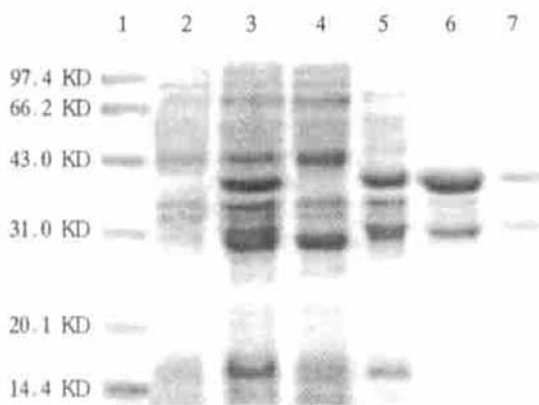
图3 大肠杆菌中诱导表达的 PRRS 病毒重组蛋白 GST-dORF5 的 Western-Blot 检测

Fig.3 Western-Blot analysis of the recombinant protein GST-dORF5 expressed in *E. coli* cell of PRRSV

2.5 重组蛋白包涵体的分离纯化与复性 超声破碎法或冻溶法裂解重组表达菌,行 SDS-PAGE 检查裂解后的上清与沉淀,结果表明表达产物以包涵体的形式存在于沉淀中,上清中几乎没有。包涵体蛋白经 3 次洗涤去除了绝大部分的菌体蛋白后,沉淀用含 8 mol/L 尿素的包涵体溶解液溶解,溶解后得到的上清再经对含不同浓度尿素的 PBS 进行梯度透析,得到复性的重组蛋白。相对复性率(复性后可

溶性蛋白/总蛋白)达到 98%。复性后的重组蛋白纯度达到 80%~85%(见图 4)。

2.6 重组蛋白的亲亲和层析纯化 让复性后的重组蛋白与适量的谷胱甘肽 Sepharose 4B 结合, PBS 充分洗涤后用还原型谷胱甘肽洗脱,得到目的蛋白(见图 5)。亲和层析纯化后目的蛋白纯度达到 90% 以上。结果显示,重组蛋白 GST-dORF5 洗脱液中有两条蛋白带,大小分别为 41.5KD 和 31-32KD,进



1. 低分子量蛋白 Marker 2. pGEX-dORF5/BL21 诱导前的菌体蛋白 3. pGEX-dORF5/BL21 诱导后的菌体蛋白 4. GST-dORF5 裂解后上清 5. GST-dORF5 裂解后沉淀 6. GST-dORF5 8 mol/L 尿素溶解后上清 7. GST-dORF5 复性后上清

图 4 重组融合蛋白 GST-dORF5 包涵体的纯化

Fig.4 Purification of inclusion bodies of recombinant fusion protein GST-dORF5

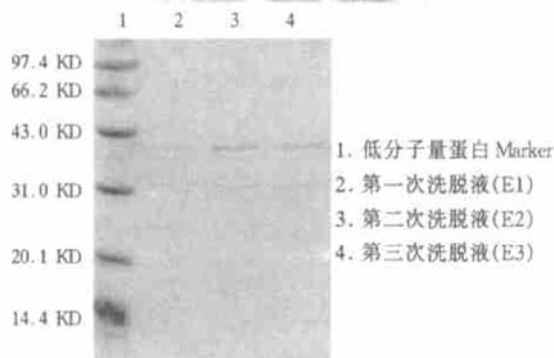


图 5 亲和层析纯化 GST-dORF5 复性后上清

Fig.5 Affinity purification of GST-dORF5 using Glutathione Sepharose 4B

一步说明 31-32 KD 的蛋白带可能是 GST-dORF5 的降解产物。

3 讨论

3.1 PRRSV BJ-4 ORF5 基因重组表达质粒的构建与诱导表达 本研究最初曾尝试在大肠杆菌中表达 BJ-4 ORF5 全长的编码基因, 利用原核表达载体 pGEX-4T-2、pET-28a、pET-28b、pET-5a、pET-34b 等构建了几种不同的原核重组表达质粒, 并在不同的宿主细胞内尝试诱导表达, 但仅能非常有限地表达目的蛋白或没有表达。一些资料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^[12, 13]。因此决定去除 N 末端的疏水序列, 即预测的信号肽序列(此段序列同时也是跨膜区), 在不影响抗原性的前提下实现高效表达。结果此基因在原核表达载体 pGEX-4T-2 中得到较好的表达, 证实了 N 末端的疏水序列对蛋白的表达量有较大影响。同时也将缺失 N 末端的疏水序列的基因片段克隆至原核表达载体 pET-28a 和 pET-5a 中, 但未获得表达, 说明表达载体对蛋白的高效表达有影响。在本研究中只去除了 N 端的一个跨膜区(信号肽部分), 若将蛋白中所有的跨膜区都去

除, 重组蛋白的表达量可能会更高, 也可能使重组蛋白部分可溶, 因此有必要进一步探讨。

资料表明^[14-17], 国外已表达的 ORF5 的重组蛋白无论在大肠杆菌中还是在昆虫杆状病毒中其表达形式都是不溶性的, 研究发现含有疏水区域或膜相关区域的蛋白一般来讲是不可溶的, 说明重组蛋白的表达形式与蛋白的性质有密切相关性。

3.2 重组表达产物包涵体的分离纯化 在溶解包涵体时, 对不同的变性条件进行了比较观察。分别用含 4 mol/L 尿素、6 mol/L 尿素、8 mol/L 尿素、6 mol/L 盐酸胍、1% Triton X-100、1% Tween-20/10 mmol/L DTT、1.5% SKL 或 0.03% SDS 溶解包涵体, 结果只有含 8 mol/L 尿素或 6 mol/L 盐酸胍的包涵体溶解液能够目的蛋白的包涵体。考虑到使用盐酸胍增加成本, 且盐酸胍能与 SDS 形成沉淀不利于进行 SDS-PAGE 检查, 所以选择尿素作为包涵体的变性剂。同时对溶液的 pH 值进行了比较, 结果表明 pH 值的不同对包涵体的溶解量影响显著; pH7.5 时, GST-dORF5 的包涵体蛋白约有 20% 的溶解; pH8.0 时, GST-dORF5 的包涵体蛋白约有 50% 的溶解; pH9.0 时, GST-dORF5 的包涵体蛋白约有 80% 的溶解。说明溶解重组蛋白的包涵体需将 8 mol/L 尿素和碱性条件(pH9.0)结合起来应用才能取得较好的实验结果。

3.3 重组蛋白的复性 蛋白质复性是十分复杂的过程, 需经历一个序变过程, 即未折叠态—中间态—折叠态, 对于一个特定的蛋白质选择何种方法需要反复试验。本研究采用梯度透析法尿素浓度逐渐降低(8 mol/L—4.5 mol/L—3.5 mol/L—2.5 mol/L—1.5 mol/L—0.5 mol/L—0 mol/L), 大大优于无梯度透析(8 mol/L—0 mol/L), 前者几乎没有沉淀聚集析出, 而后者几乎所有变性溶解的蛋白又重新聚集形成沉淀析出。实验中也曾试用尿素浓度间隔

2 mol/L 的梯度透析 (8 mol/L—4 mol/L—2 mol/L—0.5 mol/L—0 mol/L), 但有少量的蛋白聚集体析出, 效果不如间隔 1 mol/L 的梯度透析。此外, 复性时的 pH 值对反应影响较大, 在本研究中, 通过对 pH7.4 和 pH8.0 两个复性液 pH 值比较, 发现复性液的 pH 值为 8.0 时复性效果更好, 采用 pH8.0 的复性液也避免了因 pH 值变化较大而引起的蛋白聚集(包涵体溶解液的 pH 值为 9.0~10.0)。

3.4 重组蛋白的亲层析纯化 资料表明^[18], GST 融合蛋白的包涵体若能够溶解于 1% Triton X-100、1% Tween-20、10 mmol/L DTT 或 0.03% SDS, 融合蛋白仍可通过亲和层析得到较好的纯化结果, 但本研究中表达的重组融合蛋白不能溶于 1% Triton X-100、1% Tween-20/10 mmol/L DTT、1.5% SKL 或 0.03% SDS, 需复性后再进行亲和层析。依照说明书让复性的重组蛋白与 glutathion 琼脂糖珠在室温结合 30 min, 结果发现结合效率较差, 后改为在室温结合 60 min, 再在 4 °C 放置 2 h, 提高了蛋白的结合效率。GST-dORF5 亲和层析后行 SDS-PAGE 检查, 发现存在 2 条蛋白带。出现的第二条蛋白带可能为目的蛋白的降解产物, 并且在 GST-dORF5 的 Western blot 分析中也发现此蛋白带呈较主带稍弱的阳性信号。

3.5 主要结构蛋白 GP5 是糖基化的囊膜蛋白, 具有较好的免疫原性, 能够诱导产生中和抗体, 且中和抗体出现之后, 抗血清主要识别 GP5 蛋白。GP5 还具有诱导细胞凋亡的活性^[19], 此外, 有研究表明 GP5 有可能参与病毒粒子结合病毒受体的过程^[20]。因此 GP5 蛋白在 PRRSV 的致病性、诊断、预防与控制等方面具有重要意义。目前国内学者虽然已对 GP5 蛋白的本质及其免疫反应特征、在保护性免疫中作用等方面进行了大量的研究工作, 并取得了较大地进展, 但仍有很多方面尚不十分明确。因此本研究体外表达了 PRRSV 的 GP5 蛋白, 并对重组蛋白进行了纯化, 以期为进一步研究 GP5 蛋白的结构和功能奠定基础。

参考文献:

- [1] Wensvoort G, Terpstra C, Pol JMA, et al. Mystery swine disease in the Netherlands: the isolation of Lelystad virus [J]. *Vet Q*, 1991, 13: 121~130.
- [2] Terpstra C, Wensvoort G, Pol JMA. Experimental reproduction of porcine epidemic abortion and respiratory syndrome (mystery swine disease) by infection with Lelystad virus [J]. *Vet Q*, 1991, 13: 131~136.
- [3] Mengeling W L, Lager K M, Vorwald A C. Clinical effects of porcine reproductive and respiratory syndrome virus on pigs during the early postnatal interval [J]. *Am J Vet Res*, 1998, 59(1): 52~55.
- [4] Stevenson G W, Van Alstine W G, Kanitz C L, Keffaber K K. Endemic porcine reproductive and respiratory syndrome virus infection of nursery pigs in two swine herds without current reproductive failure [J]. *J Vet Diagn Invest*, 1993, 5(3): 432~434.
- [5] 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, 18(2): 1~4.
- [6] 乔传玲, 郑厚旌, 甘孟侯, 等. 反转录-聚合酶反应检测猪繁殖与呼吸综合征病毒的研究 [J]. *畜牧兽医学报*, 2000, 31(3): 262~266.
- [7] 杨汉春, 管山红, 尹晓敏, 等. 猪繁殖与呼吸综合征病毒的分离与鉴定 [J]. *中国兽医杂志*, 1997, 23(11): 3~5.
- [8] Sur J H, Doster A R, Osorio F A. Apoptosis induced *in vivo* during acute infection by porcine reproductive and respiratory syndrome virus [J]. *Vet Pathol*, 1998, 35(6): 506~514.
- [9] Delputte P L, Vanderheijden N, Nauwynck H J, Pensaert M B. 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.
- [10] 杨汉春, 黄芳芳, 郭鑫, 等. 猪繁殖与呼吸综合征病毒 (PRRSV) BJ-4 株全基因组序列测定与分析 [J]. *农业生物技术学报*, 2001, 9(3): 212~218.
- [11] J. 萨姆布鲁克, E. F. 弗里奇, T. 曼尼阿蒂斯著. 分子克隆实验指南 [M]. 金冬雁等译, 第 2 版, 北京: 科学出版社, 1993.
- [12] Hulst M M, Westra D F, Wensvoort G, Moormann R J. Glycoprotein E1 of hog cholera virus expressed in insect cells protects swine from hog cholera [J]. *J of Gen Virol*, 1993, 67: 5435~5442.
- [13] 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.
- [14] Kreutz L C, Mengeling W L. Baculovirus expression and immunological detection of the major structural proteins of porcine reproductive and respiratory syndrome virus [J]. *Vet Microbiol*, 1997, 59(1): 1~13.
- [15] Mardassi H, Massie B, et al. Intracellular synthesis, processing, and transport of proteins encoded by ORFs 5 to 7 of porcine reproductive and respiratory syndrome virus [J]. *Virology*, 1996, 221(1): 98~112.
- [16] Planar Duran 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. *Virus Genes*, 1997, 14(1): 19~ 29.
- [17] Zhang Y, Sharma R D, Paul P S. Monoclonal antibodies against conformationally dependent epitopes on porcine reproductive and respiratory syndrome virus[J]. *Vet Microbiol*, 1998, 63(2-4): 125~ 136.
- [18] Smith D B, Johnson K S. Single-step purification of polypeptides expressed in *Escherichia coli* as fusions with glutathion S-transferase[J]. *Gene*, 1988, 67: 31~ 40.
- [19] Sur J H, Doster A R, Osorio F A. Apoptosis induced *in vivo* during acute infection by porcine reproductive and respiratory syndrome virus[J]. *Vet Pathol*, 1998, 35(6): 506~ 514.
- [20] Delputte P L, Vanderheijden N, Nauwynck H J, Pennsaert M B. 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.

Prokaryotic Expression of ORF5 Gene of PRRS Virus BJ-4 and Purification of Recombinant Protein

GU Hong, YANG Han-chun, GUO Xin, CHEN Yan-hong

(The key lab of Preventive Medicine, Ministry of Agriculture, China Agricultural University, Beijing 100094, China)

Abstract: In order to successfully express the structural protein GP5 of porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV), the gene segment dORF5 deleting N-terminal very hydrophobic sequence were successfully amplified from recombinant plasmid pGEM-ORF5 by PCR and were cloned into prokaryotic expression vector pGEX-4T-2. The recombinant fusion proteins GST-dORF5 were highly expressed in *E. coli* cell BL21 in the forms of inclusion bodies and could amount to 20.8% of the total mass of bacterial proteins. Western-Blot showed the recombinant protein could react with the porcine polyclonal antibodies against PRRSV.

Recombinant proteins were purified and renatured. The purity of recombinant proteins affinity-purified using Glutathione Sepharose 4B were above 90%. The studies provided fundamental data and materials for the further study on the structure and function of structural proteins of PRRSV.

Key words: Porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV); Gene ORF5; Prokaryotic expression; Purification