

猪繁殖与呼吸综合征病毒 NJ-a 株 *ORF₆* 基因的表达 及特异性抗体的制备

郑其升¹, 杨瑞锋², 毕志香², 李鹏¹, 于春梅¹, 曹瑞兵¹, 陈溥言^{1*}

(1. 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;
2. 山东省畜牧兽医职业技术学院, 山东 潍坊 262101)

摘要: 根据 GenBank 公布的猪繁殖与呼吸综合征病毒 (porcine reproductive and respiratory syndrome virus, PRRSV) VR2332 株的核酸序列设计并合成 1 对特异性引物, 用 RT-PCR 方法扩增 PRRSV NJ-a 株 *ORF₆* 基因, 将其连接入 pMD18-T 载体, 经测序后克隆入原核表达载体 pET-32a (+) 上, 构建原核表达载体 pET-*ORF₆*。阳性质粒转化感受态大肠杆菌 BL21 (DE3), 经异醛-β-D-硫代半乳糖苷 (IPTG) 诱导, PRRSV *ORF₆* 基因获得表达。以纯化的重组蛋白为抗原免疫家兔 3 次, 获得抗 PRRSV NJ-a 株 M 蛋白的特异抗体。经 Western-blotting 证明, 该多克隆抗体既能与原核表达的重组 M 蛋白发生反应, 又能与 PRRSV 发生特异性反应; 间接免疫荧光结果表明, 获得的多克隆抗体与表达 PRRSV M 蛋白的 293T 细胞及感染 PRRSV 的 Marc-145 细胞发生反应。兔抗 PRRSV NJ-a 株 M 蛋白特异性抗体的获得, 为进一步研究 PRRSV M 蛋白的表达和功能奠定了基础。

关键词: 猪繁殖与呼吸综合征病毒 NJ-a 株; *ORF₆* 基因; 原核表达; 抗体制备

中图分类号: S852.4⁺3 文献标识码: A 文章编号: 1000-2030 (2008) 02-0154-05

Expression for the *ORF₆* gene of PRRSV NJ-a strain in *Escherichia coli* and its preparation of the specific polyclonal antiserum

ZHENG Qi-sheng¹, YANG Rui-feng², BI Zhi-xiang², LI Peng¹,
YU Chun-mei¹, CAO Rui-bing¹, CHEN Pu-yan^{1*}

(1. Key Laboratory of Animal Disease Diagnosis and Immunology, Ministry of Agriculture, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China; 2. Shandong Vocational Animal Science and Veterinary College, Weifang 262101, China)

Abstract: With a pair of specific primers designed according to the relevant sequence of porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) VR2332 strain (accession NO. AF030244), the *ORF₆* gene of PRRSV NJ-a strain isolated in our laboratory from Nanjing was amplified with RT-PCR method. The PCR product was cloned into pMD18-T vector and then sequenced. Following that, it was directly cloned into plasmid pET-32a (+) to obtain a prokaryotic expression vector pET-*ORF₆*. The positive plasmid was transformed into the host cell *E. coli* BL21 (DE3) and the *ORF₆* gene was successfully expressed with the induction of 1.0 mmol · L⁻¹ isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside (IPTG). The specific polyclonal antiserum was obtained from rabbit immunized with the purified recombinant fusion protein. Western blotting was applied to prove that the antiserum can react with both recombinant fusion M protein and PRRSV. Also, IFA test demonstrated that this polyclonal antiserum could react with the 293T cells which can express PRRSV M protein and the Marc-145 cells infected with PRRSV. Conclusions: the rabbit anti-PRRSV M protein polyclonal antiserum obtained in this study laid a foundation for further functional research and detection for the expression of M protein in eukaryotic system.

Key words: PRRSV NJ-a strain; *ORF₆* gene; prokaryotic expression; antibody preparation

猪繁殖与呼吸综合征 (porcine reproductive and respiratory syndrome, PRRS) 是由 PRRSV 引起的一种严重危害养猪业的传染病^[1]。该病于 1987 年在美国首次报道, 1996 年在国内首次分离到 PRRSV^[2]。健康猪与病猪接触、排泄物与分泌物污染的饲料等是本病传播的主要途径。该病临床上主要表现为母猪繁殖障碍, 呈现流产、死胎、木乃伊胎及弱仔; 仔猪及育成猪严重的呼吸系统症状。由于 PRRSV 具有抗原变异性, 并且其主要靶细胞是具有重要免疫功能的肺泡巨噬细胞, 因此, PRRSV 感染会造成免疫

抑制,并且经常引发其他病原体继发感染,尤其是呼吸道感染,给养猪业造成重大损失。由 *ORF₆* 基因编码的基质蛋白(M)相对分子质量为 18 000~19 000,位于病毒囊膜内,含有一个相对较大的囊膜外部区,是欧美毒株结构蛋白中最保守的蛋白。M 蛋白与由 *ORF₅* 编码的 GP₅ 蛋白以异源二聚体的形式存在于 PRRSV 粒子的表面。M-GP₅ 聚合物在病毒对肺泡巨噬细胞附着和病毒侵染中起重要作用,聚合物主要与肺泡巨噬细胞表面的肝磷脂受体发生反应^[3-5]。此外,M 蛋白本身具有很强的免疫原性,用体外表达的重组 M 蛋白可以作为血清学试验的靶抗原^[6]。因此研究和分析该蛋白的免疫特性及其功能对于研制更安全、更有效的新型 PRRSV 疫苗具有重要意义,而获得针对 PRRSV M 蛋白的特异性抗体是开展这些研究工作的基础。本实验室从南京地区 2005 年某急性发病猪场采集的病料中分离获得 PRRSV NJ-a 株,并对该毒株的分子特征进行了初步研究。在此基础上,笔者用原核表达系统成功表达了该毒株的 *ORF₆* 基因,并以纯化的重组 M 蛋白为抗原免疫家兔制备了抗血清,利用 Western-blotting 与间接免疫荧光检测制备的兔抗 PRRSV M 蛋白特异性多抗反应活性,为进一步研究 M 蛋白的功能,研制抗 PRRSV 病毒感染的基因工程疫苗和诊断试剂奠定基础。

1 材料与方 法

1.1 病毒、细胞及载体

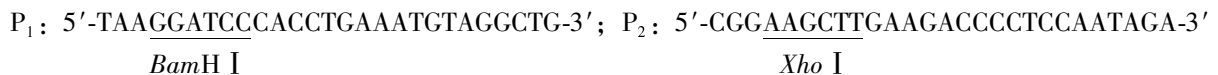
PRRSV NJ-a 株为 2005 年从南京某急性发病猪群中分离的 PRRSV 美洲株强毒,由南京农业大学农业部动物疫病诊断与免疫重点开放实验室鉴定、保存;293T 细胞、Marc-145 细胞购自中国典型培养物中心;重组真核表达质粒 pcDNA-ORF₆ 为笔者自行构建,系将 PRRSV NJ-a 株完整的 *ORF₆* 基因克隆入真核表达载体 pcDNA 3.0 的 *Hind* III 与 *Eco*R I 位点之间;原核表达载体 pET-32a (+)、宿主菌 BL21 (DE3) 与 DH5 α 均为本实验室保存。

1.2 主要试剂及工具酶

病毒总 RNA 提取试剂盒购自 Promega 公司;胶回收试剂盒购自上海华舜生物技术公司;限制性内切酶 *Bam*H I、*Xho* I、反转录酶 M-MLV 与 DNA 连接酶、*Taq*DNA 聚合酶等工具酶,均购自大连 TaKaRa 公司;DMEM 培养基为 GIBCO 公司产品;新生牛血清购自杭州四季青生物工程有限公司;DAB 显色试剂盒购于南京生兴生物公司;弗氏完全佐剂与弗氏不完全佐剂为 Sigma 公司产品。蛋白亲和层析纯化试剂为 GE 公司产品。

1.3 引物设计

参照 GenBank 公布的 PRRSV VR2332 株核酸序列 (No: AF066183) 利用 PrimerPremier 5.0 软件自行设计引物,由大连 TaKaRa 公司合成。为了便于基因的克隆及表达等后续工作,在如下上、下游引物 5'端分别加入 *Bam*H I 和 *Xho* I 位点 (引物中划线部分):



1.4 PRRSV *ORF₆* 基因的扩增

取利用 Marc-145 细胞增殖的 PRRSV NJ-a 株病毒悬液 500 μ L,按 Promega 公司病毒总 RNA 提取试剂盒说明提取病毒的总 RNA。将提取的病毒总 RNA 溶解于 20 μ L 焦碳酸二乙酯 (DEPC) 处理 H₂O 中,立即进行 RT-PCR。反转录结束后取 5 μ L 反转录产物作为模板进行 PCR 扩增。PCR 反应条件:94 $^{\circ}$ C 5 min;94 $^{\circ}$ C 30 s,51 $^{\circ}$ C 30 s,72 $^{\circ}$ C 45 s,30 个循环;72 $^{\circ}$ C 10 min。用 1.0% 的琼脂糖凝胶电泳鉴定 PCR 产物,按照胶回收试剂盒说明书回收目的基因。

1.5 PRRSV *ORF₆* 基因的克隆、鉴定及表达载体的构建

将回收的目的基因克隆入 pMD18-T 载体上,转化感受态大肠杆菌 DH5 α ,挑取单个菌落,接种于含氨苄青霉素 (Amp⁺, 50 μ g \cdot mL⁻¹) 的液体 LB 培养基中培养。用小量法提取质粒,用 *Bam*H I 和 *Xho* I 双酶切鉴定。将阳性菌液送交大连 TaKaRa 公司进行测序。从 pMD-ORF₆ 中用 *Bam*H I、*Xho* I 酶切获得 *ORF₆* 基因,克隆入原核表达载体 pET-32a (+) 相应位点,利用 *Bam*H I、*Xho* I 双酶切鉴定,阳性克隆命名为 pET-ORF₆。

1.6 pET-ORF₆ 的诱导表达、纯化

将 pET-ORF₆/BL21 细菌培养至 D_{600} 达到 0.5, 加入异醛- β -D-硫代半乳糖苷 (IPTG), 使其终浓度达到 $1.0 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$, $30 \text{ }^\circ\text{C}$ 诱导 4 h; 同时设 pET-32a (+)/BL21 诱导对照与未诱导的 pET-ORF₆/BL21 对照。取出 1.0 mL 诱导后的细菌, $12\,000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 30 s, 沉淀重悬于 $100 \text{ } \mu\text{L}$ $1 \times \text{SDS-PAGE}$ 凝胶电泳上样缓冲液中, $100 \text{ }^\circ\text{C}$ 变性 5 min, 进行 SDS-PAGE 电泳。按照 His Bind Kit 说明书纯化重组 M 蛋白。

1.7 兔抗 PRRSV M 蛋白特异性抗体的制备

以纯化的重组 M 蛋白为抗原免疫成年新西兰白兔 3 次, 程序如下: 初次免疫用 $200 \text{ } \mu\text{g}$ 融合蛋白加弗氏完全佐剂, 于足垫下多点注射。初次免疫后 14 d 用 $200 \text{ } \mu\text{g}$ 融合蛋白加弗氏不完全佐剂, 于后肢变肿大的淋巴结注射作加强免疫。再次免疫后 28 d, 用 $200 \text{ } \mu\text{g}$ 融合蛋白于背部皮下加强免疫 1 次。每次免疫前, 均取耳血分离血清。末次免疫后 7 d, 放血分离血清, 用间接 ELISA 法测定抗体效价并分装冻存。

1.8 多克隆抗体的 Western-blotting 鉴定

利用制备的兔抗 PRRSV M 蛋白多克隆抗体作为一抗与纯化的重组 M 蛋白以及 PRRSV NJ-a 株感染的 Marc-145 细胞进行免疫印迹分析, 具体操作按文献 [5] 介绍的方法进行。

1.9 多克隆抗体的 IFA 鉴定

将表达 PRRSV M 蛋白的真核质粒 pcDNA-ORF₆ 转染 293T 细胞, 将 PRRSV NJ-a 株感染 Marc-145 细胞, 利用制备的多克隆抗体进行间接免疫荧光检测。

2 结果与分析

2.1 PRRSV NJ-a 株 ORF₆ 基因的扩增及序列分析

琼脂糖电泳 (图 1) 结果显示, 有 1 条长度稍大于 500 bp 的目的条带, 与预期结果相符。重组质粒 pMD-ORF₆ 用 *Bam*H I 和 *Xho* I 酶切, 也得到相应的片段 (图略)。

应用 DNASTAR 软件分析可知, 所得序列与 PRRSV 弱毒 VR2332 株的核苷酸序列同源性为 99.8%。这一结果也证实了 ORF₆ 基因在 PRRSV 病毒中的保守性。

2.2 重组表达载体的双酶切鉴定结果

pET-ORF₆ 双酶切产物电泳后 (图 2), 出现 5 900 bp 的载体片段与 525 bp 的目的基因片段, 而同时酶切的 pET-32a (+) 空载体却没有 525 bp 的目的基因片段, 表明重组质粒已构建成功。

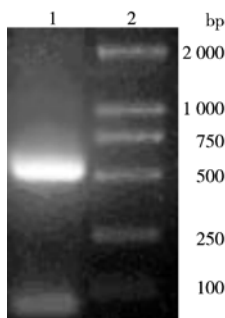


图 1 RT-PCR 产物扩增结果

Fig. 1 The amplified product of PRRSV ORF₆ gene

1. RT-PCR 扩增片段 Amplified fragment of ORF₆ gene; 2. DNA 分子质量标准 (DL2000) DNA molecular weight marker (DL2000)

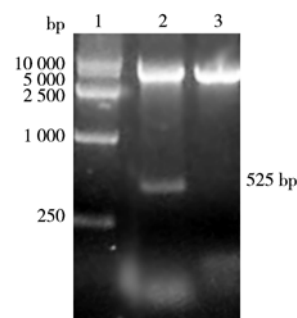


图 2 重组质粒 pET-ORF₆ 的鉴定

Fig. 2 Identification of recombinant plasmid pET-ORF₆

1. DNA 标准品 DNA marker (DL15000); 2-3. *Bam*H I 和 *Xho* I 双酶切 pET-ORF₆ 和 pET-32a (+) pET-ORF₆ and pET-32a (+) digested by *Bam*H I and *Xho* I

2.3 表达产物的 SDS-PAGE 电泳分析

重组质粒 pET-ORF₆ 转化大肠杆菌 BL21 感受态细胞, 经 IPTG 诱导后, 获得高效表达。经 SDS-PAGE 电泳分析, 在相对分子质量 40×10^3 (箭头处) 处出现 1 条明显的蛋白条带 (图 3), 大小与预期结果相符, 而空载体对照与诱导前对照均无该蛋白带。

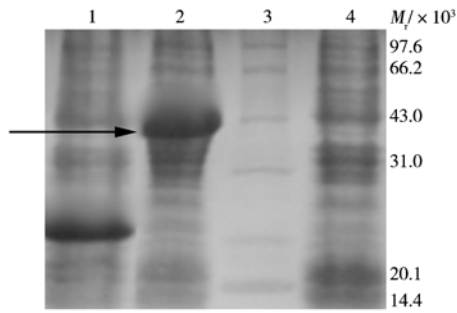


图 3 表达产物的 SDS-PAGE 分析

Fig. 3 Analysis of the expressed product by SDS-PAGE

1-2. 经 IPTG 诱导的 pET-32a (+) /BL21 和 pET-ORF₆/BL21 pET-32a (+) /BL21 and pET-ORF₆/BL21 induced with IPTG; 3. 标准蛋白质 Protein marker; 4. 未经 IPTG 诱导的 pET-ORF₆/BL21 pET-ORF₆/BL21 untreated with IPTG

2.4 重组蛋白纯化及免疫效价检测

用 Elute Buffer 洗脱目的蛋白，分管收集后进行 SDS-PAGE 电泳，结果在 40 × 10³ 处出现 1 条清晰的蛋白条带（图 4），无杂蛋白条带，说明表达产物纯化良好。利用该蛋白免疫家兔，获得抗 M 蛋白血清，经 ELISA 法检测抗体效价为 1:12 800。

2.5 多克隆抗体的特异性鉴定

如图 5 所示，在免疫印迹分析中，该多克隆抗体能与纯化的融合蛋白 M 发生反应；用 PRRSV 与兔抗 PRRSV M 蛋白多克隆抗体进行 Western-blotting 分析，结果发现该多克隆抗体也与天然的 M 蛋白发生反应（图 5）。应用间接免疫荧光方法（IFA）检测感染 PRRSV 的 Marc-145 细胞及转染真核质粒 pcDNA-ORF₆ 的 293T 细胞与 M 多克隆抗体的反应性，结果显示反应性较好（图 6）。证明本试验中制备的抗 PRRSV M 蛋白的多克隆抗体具有生物学活性。

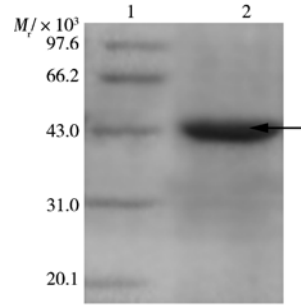


图 4 蛋白纯化后的 SDS-PAGE

Fig. 4 Purification of the expressed product by SDS-PAGE

1. 标准蛋白质 Protein marker; 2. 纯化的重组 PRRSV M 蛋白 Purified recombinant PRRSV M protein

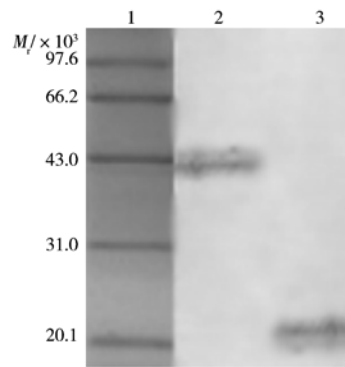


图 5 多克隆抗体特异性的 Western-blotting 鉴定

Fig. 5 Identification for the polyclonal antiserum with Western-blotting

1. 标准蛋白质 Protein marker; 2. 多克隆抗体与纯化的重组 M 蛋白反应 Polyclonal antiserum reacts with the purified recombinant M protein; 3. 多克隆抗体与 PRRSV 感染的 Marc-145 细胞反应 Polyclonal antiserum reacts with PRRSV infected Marc-145 cells

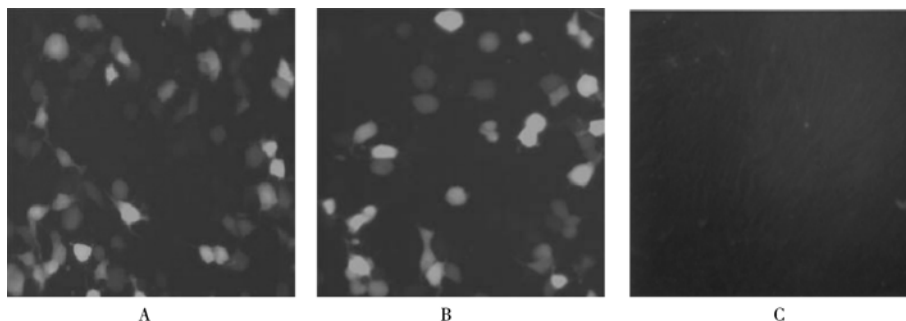


图 6 多克隆抗体特异性的 IFA 检测

Fig. 6 Identification for the polyclonal antiserum with IFA

A. 多克隆抗体与 PRRSV 感染的 Marc-145 细胞反应 Polyclonal antiserum reacts with PRRSV infected Marc-145 cells; B. 多克隆抗体与转染 pcDNA-ORF₆ 的 293T 细胞反应 Polyclonal antiserum reacts with pcDNA-ORF₆ transfected 293T cells; C. 阴性对照 Negative control

3 讨论

目前，PRRS 已成为危害养猪业最严重的传染病之一^[7-8]。由于 PRRSV 具有抗原变异性，并且其主要靶细胞是具有重要免疫功能的肺泡巨噬细胞，因此，PRRSV 的感染常引发其他病原的继发感染，尤

其是呼吸道感染, 给养猪业造成重大损失。

由 *ORF₆* 编码的非糖基化蛋白 (M) 在所有的 PRRSV 株间高度保守, 在欧、美型毒株间也最为保守。通过感染猪康复血清的免疫印迹试验证明了 M 蛋白具有很强的免疫原性, 感染后 10 d 就可以检测到抗体。因此, 表达重组的 M 蛋白可作为血清学试验的靶抗原用于 PRRSV 感染的早期诊断。在体外利用 *ORF₆* 基因的表达产物诱导的 T 细胞增生反应比其他结构蛋白更强烈, 表明 M 蛋白在细胞介导的免疫反应中可能起主要作用。该蛋白为 III 型跨膜非糖基化蛋白, 与细胞膜相联系, 在感染细胞中呈过量表达; 该蛋白基因也是最保守的, 其多肽结构对于 PRRSV 的装配非常关键。因此, 研究 M 蛋白对 PRRSV 感染的早期诊断及预防 PRRSV 感染的基因工程疫苗的研制具有重要意义^[9]。

本研究将 PRRSV NJ-a 株 *ORF₆* 基因克隆到原核表达载体 pET-32a (+) 中, 获得原核表达载体 pET-ORF₆, 将其转化大肠杆菌 BL21, 在 1.0 mmol · L⁻¹ IPTG 诱导下, 成功地获得了表达。将纯化的 M 蛋白免疫家兔, 制备了抗血清。通过 Western-blotting 与间接免疫荧光试验, 证明制备的特异性多克隆抗体具有较好的生物学活性。这与研制 M 蛋白的单克隆抗体相比具有试验过程简单, 成本低廉等优点。在后续工作中, 一方面可以利用该原核表达产物建立反映机体抗体水平的特异性诊断方法; 另一方面, 该特异性抗体的制备为以 M 蛋白为基础的 PRRSV 新型基因工程疫苗的研制以及对疫苗激发免疫反应的检测提供了基础材料。

参考文献:

- [1] Keffaber K K. Reproductive failure of unknown etiology [J]. Am Assoc Swine Pract Newsletter, 1989, 1(2): 1-9
- [2] Shimizu M, Yamada S, Murakami Y, et al. Isolation of porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) virus from Heko-heko disease of pigs [J]. J Vet Med Sci, 1994, 56(2): 389-391
- [3] Pirzadeh B, Gagnon C A, Dea S. Genomic and antigenic variations of porcine reproductive and respiratory syndrome virus major envelope GP₃ glycoprotein [J]. Can J Vet Res, 1998, 62(3): 170-177
- [4] López Fuertes L, Doménech N, Alvarez B, et al. Analysis of cellular immune response in pigs recovered from porcine respiratory and reproductive syndrome infection [J]. Virus Res, 1999, 64(1): 33-42
- [5] Balasuriya U B R, Heidner H W, Davis N L, et al. Alphavirus replicon particles expressing the two major envelope proteins of equine arteritis virus induce high level protection against challenge with virulent virus in vaccinated horses [J]. Vaccine, 2002, 20: 1609-1617
- [6] Dea S, Gagnon C A, Mardassi H, et al. Antigenic variability among North American and European strains of porcine reproductive and respiratory syndrome virus as defined by monoclonal antibodies to the matrix protein [J]. Clin Microbiol, 1996, 34(6): 1488-1493
- [7] Wensvoort G, Terpstra C, Pol J M A, et al. Mystery swine disease in the Netherlands: isolation of Lelystad virus [J]. Vet Q, 1991, 13: 121-130
- [8] 郭宝清, 陈章水, 刘文兴, 等. 从疑似 PRRS 流产胎儿分离猪繁殖与呼吸障碍综合征病毒 (PRRSV) 的研究 [J]. 中国畜禽传染病, 1996(2): 1-5
- [9] 杨金雨, 仇华吉, 童光志. 猪繁殖与呼吸综合征疫苗研究进展 [J]. 动物医学进展, 2005, 26(5): 28-31

责任编辑: 周广礼