

猪繁殖与呼吸综合征病毒感染细胞中 非结构蛋白 Nsp2 表达分析

温贵兰^{1,2}, 张涵淞¹, 扈鸿霞¹, 章先¹, 张毅², 王晓杜¹, 李肖梁¹, 方维焕^{1*}

(1. 浙江大学动物预防医学研究所, 浙江省动物预防医学重点实验室, 杭州 310058;

2. 贵州大学动物预防医学实验室, 贵阳 550025)

摘要: 猪繁殖与呼吸综合征病毒 (porcine reproductive and respiratory syndrome virus, PRRSV) 非结构蛋白 Nsp2 对病毒复制和致病具有重要作用, 本研究旨在分析 Nsp2 在 Marc-145 细胞内的分布与表达。构建 *nsp2* 含 *PL2* 区域基因片段的原核表达载体, 重组蛋白纯化后作为免疫抗原, 制备 Nsp2 特异性单克隆抗体。将携带 *nsp2* 基因的真核表达载体转染至 Marc-145 及 HEK293 细胞, 或将 PRRSV 感染 Marc-145 细胞后不同时间点收集细胞样品。免疫荧光观察 Nsp2 在转染细胞中的亚细胞定位, 免疫印迹分析 Nsp2 在真核细胞中的表达。筛选获得了 1 株稳定分泌特异性抗 Nsp2 的单克隆杂交瘤细胞株, 能用于免疫荧光和印迹分析。重组真核表达质粒转染 Marc-145 与 HEK293 细胞后, Nsp2 主要定位于细胞质中, 免疫印迹检测到约为 120 与 50 ku 的蛋白条带。PRRSV 感染 Marc-145 细胞 4 h 即可检测到 Nsp2 的表达, 主要定位于细胞核周围, 随着感染时间延长 Nsp2 分布范围逐渐扩大至整个细胞质。病毒感染 8 h, 可检测到 120 ku 左右的 Nsp2 蛋白条带, 感染后 12 h 可检测到 70 和 50 ku 左右的 Nsp2 蛋白, 且蛋白表达量随感染时间延长显著增多。PRRSV 感染细胞中 Nsp2 的表达与剪切分析, 为深入研究该蛋白在病毒复制和致病中的功能奠定了基础。

关键词: 猪繁殖与呼吸综合征病毒; 非结构蛋白 Nsp2; 表达与剪切方式

中图分类号: S852.659.6

文献标志码: A

文章编号: 0366-6964(2013)07-1109-08

Analysis of Nsp2 Expression in Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus Infected Cells

WEN Gui-lan^{1,2}, ZHANG Han-song¹, HU Hong-xia¹, ZHANG Xian¹, ZHANG Yi²,
WANG Xiao-du¹, LI Xiao-liang¹, FANG Wei-huan^{1*}

(1. Institute of Preventive Veterinary Medicine & Zhejiang Provincial Key Laboratory of Preventive Veterinary Medicine, Zhejiang University, Hangzhou 310058, China; 2. Laboratory of Preventive Veterinary Medicine, Guizhou University, Guiyang 550025, China)

Abstract: The Nsp2 protein of porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) plays an important role in viral replication and pathogenesis. We attempted to analyze the expression and distribution of Nsp2 in Marc-145 cells infected with PRRSV to provide some basis of further investigation of its pathogenesis. The *nsp2* gene fragment (covering the *PL2* region) was cloned into the prokaryotic expression vector and purified recombinant protein was used as antigen to prepare specific monoclonal antibody. The eukaryotic expression plasmid containing *nsp2* gene fragment was transfected into Marc-145 or HEK293 cells. PRRSV infected-Marc-145 cells were collected at different time points. Immunofluorescence and Western blotting were used to an-

收稿日期: 2013-01-22

基金项目: 浙江省重大科技专项重点农业项目 (2012C12003-2); 宁波市农业攻关项目 (2011C10003); 中国博士后基金 (2012M521187)

作者简介: 温贵兰 (1977-), 女, 贵州普定人, 副教授, 博士, 主要从事分子微生物学研究, E-mail: guilanwen@hotmail.com, Tel: 0571-88982986

* 通信作者: 方维焕, 教授, Tel/Fax: +86-0571-88982242, E-mail: whfang@zju.edu.cn

alyze the distribution and expression of Nsp2 in cells. A monoclonal hybridoma cell line secreting specific anti-Nsp2 antibody was obtained. The antibody was suitable for immunoblotting and immunofluorescence. Nsp2 was present in the cytosol of Marc-145 or HEK293 cells transfected with the recombinant plasmid. There were two protein bands of about 120 and 50 kDa shown by Western blotting. Expression of Nsp2 in PRRSV-infected Marc-145 cells could be detected initially in the perinuclear cytoplasm at 4 h post-infection, and then throughout the cytoplasm. The major Nsp2 protein at about 120 kDa was seen at 8 h post-infection. Two smaller bands of 70 and 50 kDa were detected at 12 h post-infection. Protein expression increased over time. The expression and cleavage patterns of Nsp2 in PRRSV-infected cells might indicate differential functions of the protein during viral replication and pathogenesis that await further investigation.

Key words: reproductive and respiratory syndrome virus; non-structural protein Nsp2; patterns of expression and cleavage

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) 所引起猪的一种高度接触性传染病, 可导致母猪流产、仔猪高死亡率等临床特征。由于 PRRSV 易引起猪群的免疫抑制, 大多数病例因继发感染条件致病菌而复杂化, 给养猪业造成严重经济损失^[1-3]。PRRSV 属于套式病毒目 (Nidovirales) 动脉炎病毒科 (Arteriviridae) 成员之一, 其基因组为单股正链 RNA, 至少具有 10 个开放阅读框 (ORFs), 即 ORF1a、ORF1b、ORF2a、ORF2b、ORF3~7 及 ORF5a。ORF1 编码所有非结构蛋白, 已知有 14 个非结构蛋白 Nsp1 α 、Nsp1 β 、Nsp2~6、Nsp7 α 、Nsp7 β 、Nsp8~12^[4]。Nsp2 分子量较大, 且含有多个结构域; 经典北美型毒株 VR2332 具有 1 196 个氨基酸, 包括半胱氨酸酶 (PL2) 区域、一个中间的高变区 (HV)、跨膜区 (TM) 和 C 末端^[5]。PL2 区域兼有木瓜蛋白酶样与胰凝乳蛋白酶样特性, 是卵巢肿瘤蛋白酶家族新成员, 具有反式和顺式裂解活性^[6]。Nsp2 是一个多功能蛋白, 不仅作为复制酶参与病毒的复制, 也调节宿主的先天性免疫应答^[7-9]。显然, Nsp2 在 PRRSV 致病中具有重要作用, 但其结构和功能还有很多未知的方面。本研究克隆 PRRSV 流行毒株 JX-07 的 *nsp2* 基因, 构建带 Flag 标签的 *nsp2* 真核表达质粒 pcDNA3-Nsp2, 同时制备抗 Nsp2 特异的单克隆抗体, 利用间接免疫荧光和免疫印迹分析 Nsp2 在瞬时感染与感染细胞中的亚细胞定位与表达特征, 研究将为进一步揭示 PRRSV 病毒复制机制, Nsp2 的生物学功能以及 PRRSV 致病机制奠定基础。

1 材料与方法

1.1 菌株、分离病毒株和细胞

大肠杆菌 (*Escherichia coli*) 菌株 DH5 α 由本实验室保存; PRRSV 流行毒株 JX-07 (基因 II 型, 基因组的 GenBank No. JQ798255) 由本实验室从发病猪场分离、鉴定并保存。Marc-145 和 HEK293 细胞系为本实验室保存。

1.2 主要试剂

LipofectamineTM 2000 购自 Invitrogen 公司; 总 RNA 提取试剂盒购自天根生化科技有限公司; M-MLV 反转录酶和被动裂解液 (Passive Lysis Buffer, PLB) 购自 Promega 公司; Prime STAR DNA 聚合酶、限制性内切酶 *Bam*H I 和 *Xba* I、Oligo d(T)₁₅、DNA 连接试剂 Solution I 等均购自 TaKaRa 公司; Trans 5K DNA Marker 购自北京全式金生物技术有限公司; 凝胶回收试剂盒购自 Axygen 公司; 质粒小量抽提试剂盒、丙烯酰胺等购自上海生工生物有限公司; 镍琼脂糖凝胶亲和柱购自北京韦氏博慧色谱科技有限公司; RPMI 1640、高糖 DMEM 培养基、次黄嘌呤、氨基嘌呤等购自 GIBCO 公司; 胎牛血清 (FBS) 购自杭州四季青生物工程材料研究所; 抗 Flag 单克隆抗体 (产品编号 F3165)、聚乙二醇 1450 (PEG-1450)、弗氏完全佐剂 (FCA)、不完全佐剂 (FIA)、DMSO 等均购自 Sigma 公司; HRP 和 FITC 标记的羊抗鼠 IgG 购自 KPL 公司; 引物由上海英骏生物技术有限公司合成。其余常规试剂为国产分析纯。

1.3 *nsp2* 原核表达质粒构建与重组原核蛋白表达

1.3.1 病毒总 RNA 的提取 采用 Trizol 试剂

盒提取 PRRSV 感染的 Marc-145 细胞总 RNA, 操作步骤按天根试剂盒说明书进行。

1.3.2 cDNA 第一链合成 以 1.3.1 提取的 RNA 为模板反转录获得 cDNA。反转录体系: RNA 1 μg , Oligo d(T)₁₅ 0.5 μg , 70 °C 作用 5 min; dNTP Mix (2.5 mmol · L⁻¹) 1.5 μL , 5 × M-MLV buffer 6 μL , RNasin® 核酸酶抑制剂 10 U, M-MLV 酶 100 U, 补水至 30 μL 。42 °C 反转 60 min, 75 °C 灭活 15 min。

1.3.3 引物设计 根据分离毒株 PRRSV JX-07 株 *nsp2* 核酸序列 (GenBank No. JQ798255), 设计针对包含 *nsp2-PL2* 基因的特异性引物, 引物间跨度 831 bp。Nsp2-pl2-*Nde* I-F: GGAATTCATATG TACTCTCCGCCTGCTG; Nsp2-pl2-*Hind* III-R: CCCAAGCTTCAAAGGCTCTTGAGTCACG。

1.3.4 PCR 扩增 扩增体系: 1 μL cDNA, 6 μL 5 × PCR buffer, 0.5 μL Nsp2-pl2-F (25 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$), 0.5 μL Nsp2-pl2-R (25 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$), 2.4 μL dNTP Mix (2.5 mmol · L⁻¹), 0.5 μL PrimeSTAR, ddH₂O 补至 30 μL 。扩增参数: 94 °C 预变性 3 min; 94 °C 5 s, 62 °C 10 s, 72 °C 52 s, 进行 30 个循环; 最后 72 °C 延伸 10 min, PCR 产物用 1% 琼脂糖凝胶电泳检测。

1.3.5 Nsp2 原核表达质粒构建 PCR 产物采用 Axygen 试剂盒割胶纯化。用 *Nde* I 和 *Hind* III 分别对割胶纯化的 PCR 产物与载体 pET30a (+) 进行双酶切, 纯化的酶切产物与载体用 Solution I 进行连接, 构建重组质粒 pET-30a (+)-*nsp2*。将重组质粒转化至 BL21 (DE3) 感受态细菌, 菌液 PCR 筛选阳性菌株, 菌液 PCR 阳性的菌株提质粒进行双酶切鉴定, 酶切正确的再送至上海英骏公司测序。最终获得克隆正确的阳性重组菌命名为 BL21-pET-30a (+)-*nsp2*, 预测表达蛋白相对分子质量大小为 31.5 ku。

1.3.6 重组原核蛋白表达与纯化 重组菌 BL21-pET-30a (+)-*nsp2* 新鲜培养物以 1 : 100 分别接种于含卡那霉素 (终浓度 1 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) 的液体 LB 培养基, 培养 3~4 h 至菌液 OD_{600 nm} 值为 0.6 时加入 IPTG (终浓度 1 mmol · L⁻¹), 37 °C 诱导表达 4 h, 诱导产物进行可溶性分析, 重组表达的蛋白采用镍柱纯化, 纯化蛋白命名为 rHis-Nsp2。

1.4 携带 Flag 标签的 *nsp2* 真核表达质粒构建

根据分离毒株 PRRSV JX-07 株 *nsp2* 核苷酸序

列 (GenBank No. JQ798255), 设计针对除 C 端 206 个氨基酸外的 *nsp2* 基因片段的特异性引物, 引物间跨度 2 970 bp。Nsp2-*Bam*H I-F: 5' CGCGGATC CAAGTGGTACGGTGCTGGAAAG; Nsp2-*Xba* I-R: 5' CTAGTCTAGACAGATGTAGCGTGC-CCCGCCAG。

以 cDNA 为模板, Nsp2-*Bam*H I-F 与 Nsp2-*Xba* I-R 为引物进行 PCR 扩增, 获得目的基因构建到真核表达质粒 pcDNA3-5'Flag 上, 构建与鉴定过程同 1.3, 克隆正确的阳性重组质粒命名为 pcDNA3-5'Flag-Nsp2。

1.5 杂交瘤细胞制备与单克隆抗体效价测定

将纯化后的重组蛋白 rHis-Nsp2 与等体积的弗氏完全佐剂乳化后, 皮下多点注射 6~8 周龄 BALB/c 小鼠, 200 $\mu\text{g} \cdot \text{只}^{-1}$ 。14 d 后, 改用弗氏不完全佐剂乳化重组蛋白, 皮下多点免疫 (100 $\mu\text{g} \cdot \text{只}^{-1}$), 间隔 14 d 后, 重复 1 次, 第 3 次免疫后, 测定抗体效价。细胞融合前 3 d 腹腔注射加强免疫 1 次 (100 $\mu\text{g} \cdot \text{只}^{-1}$)。

细胞融合、筛选、克隆按常规方法进行。采用体内诱生法制备腹水, 收集腹水加入等体积甘油, 分装, -70 °C 保存。采用间接 ELISA、IFA 和 WB 方法测定腹水效价。

1.6 间接免疫荧光试验

转染重组质粒 24 h 后的细胞或 PRRSV 感染的 Marc-145 细胞, 用预冷的 80% 丙酮固定 30 min, 抗 Flag 标签抗体 (1 : 1 000) 或抗 Nsp2 单克隆抗体 (1 : 1 000) 37 °C 作用 1 h, 然后以 FITC 标记的羊抗鼠 IgG 作为二抗, 37 °C 作用 1 h, 4', 6, -diamidino-2-phenylindole (DAPI) 进行细胞核染色, 封片后采用共聚焦显微镜 (奥林巴斯, FV1000-IX81) 进行观察并拍照。

1.7 免疫印迹试验

转染质粒 pcDNA3-Nsp2 24 h 后的 Marc-145、HEK293 细胞以及感染 PRRSV 的 Marc-145 细胞, 经裂解液处理后, BCA 法测定蛋白质浓度, 所得样品上样 20 μg , 经 SDS-PAGE 电泳后, 半干转印法将蛋白转移至 0.45 μm 的 PVDF 膜上, 以抗 Flag 或 Nsp2 单克隆抗体为一抗, 4 °C 作用过夜; HRP 标记的羊抗鼠抗体作为二抗, 1 : 3 000 倍稀释, 37 °C 作用 1 h 后, 采用 Pierce 公司的 ECL 发光试剂盒进行蛋白印迹成像。

1.8 真核表达 Nsp2 在 Marc-145 和 HEK293 细胞中的亚定位与表达分析

用 Lipofectamine™ 2000 将重组质粒 pcDNA3-Nsp2 或空载体转染至 HEK293 或 Marc-145 细胞 (操作步骤按 Lipofectamine™ 2000 说明书进行), 转染 24 h 后收集细胞, 用 Flag 标签抗体或 Nsp2 单克隆抗体分别进行间接免疫荧光 (IFA) 与免疫印迹 (WB) 试验, 检测其在 HEK293 与 Marc-145 中的定位与表达, 操作方法按 1.4 和 1.5 所述进行。

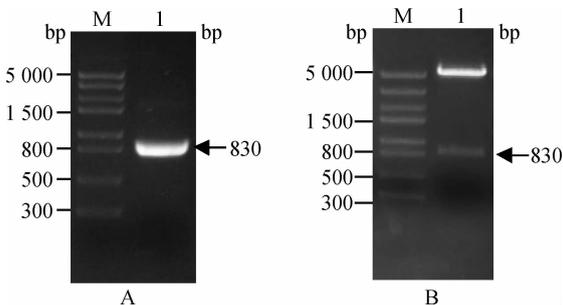
1.9 Nsp2 在感染 PRRSV Marc-145 细胞中的亚定位与表达分析

PRRSV 吸附 Marc-145 细胞 1 h 后改换 5% FBS DMEM 维持液 (此时计为 0 h), 分别在 4、6、8、10、12、24、36 h 收集样本, 利用 Nsp2 单克隆抗体分别进行 IFA 与 Western blotting 试验, 分析 PRRSV 复制过程中 Nsp2 在 Marc-145 细胞中的定位与基因表达, 操作方法按 1.6 和 1.7 所述进行。

2 结果

2.1 nsp2 原核表达质粒构建

针对 PRRSV 分离毒株 *nsp2* 特定区域进行 PCR 扩增, PCR 产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳, 可见约 830 bp 的特异性条带, 与预期大小相符 (图 1A)。重组质粒 pET-30a (+)-nsp2 经 *Nde* I 和 *Hind* III 双酶切, 可见 5 000 与 830 bp 左右 2 条特异性条带 (图 1B); 同时测序结果证实目的基因正确插入质粒中。



M. 5K DNA 相对分子质量标准; A-1. *nsp2* PCR 产物; B-1. *Nde* I、*Hind* III 酶切产物

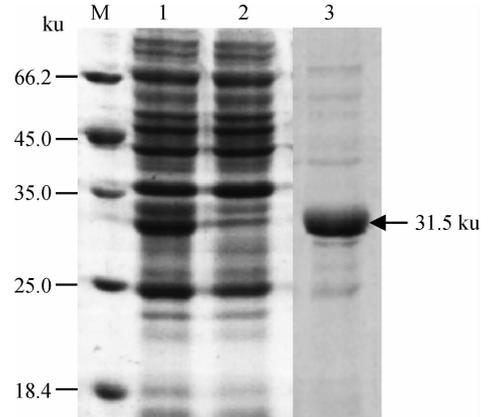
M. 5K DNA marker; A-1. Specific fragment of *nsp2* was amplified from the PRRSV genome using PCR; B-1. The PCR product digested by *Nde* I and *Hind* III from pET-30a (+)-nsp2

图 1 携带 PRRSV *nsp2* 的原核表达质粒 pcDNA3-nsp2 鉴定

Fig. 1 Identification of the prokaryotic recombinant plasmid containing PRRSV-*nsp2*

2.2 Nsp2 重组原核蛋白表达与纯化

重组大肠杆菌 BL21-pET-30a (+)-nsp2 经 IPTG 诱导, 目的蛋白主要以包涵体形式表达, 用含 $8 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 尿素的 $50 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ PBS 溶解菌体, 超声波裂解后取上清, 经用镍柱纯化后的目的蛋白条带大小与预期 31.5 ku 相符, 表明重组蛋白 rHis-Nsp2 正确表达 (图 2)。



M. 蛋白质相对分子质量标准; 1. pET-30a (+)-nsp2 IPTG 诱导产物; 2. pET-30a (+)-nsp2 未经 IPTG 诱导产物; 3. 纯化的 rHis-Nsp2 重组蛋白

M. Protein marker; 1. The lysate of BL21-pET-30a (+)-nsp2 induced by IPTG; 2. The lysate of BL21-pET-30a (+)-nsp2 without induction; 3. Purified recombinant protein rHis-Nsp2

图 2 重组表达产物的 SDS-PAGE 分析

Fig. 2 Analysis of expressed products by SDS-PAGE

2.3 pcDNA3-5' Flag-nsp2 真核表达质粒构建

通过 RT-PCR 获得了 *nsp2* 基因的片段, 所得条带与预期大小相符 (2 970 bp, 图 3A)。所得 PCR 产物经 *Bam*H I 和 *Xba* I 双酶切后, 克隆于真核表达质粒 pcDNA3-5' Flag, 获得重组质粒 pcDNA3-5' Flag-Nsp2。该质粒经 *Bam*H I 和 *Xba* I 双酶切后, 可见约 5 000 bp 的载体片段与 2 970 bp 目的基因片段 (图 3B)。所得阳性克隆序列 (上海英潍捷基公司测序) 与 PRRSV-Nsp2 (GenBank No.: JQ798255) 相似性为 100%, 表明该基因正确插入真核表达载体。

2.4 单克隆抗体的特异性鉴定与效价测定

用制备的单克隆抗体对原核表达纯化的 Nsp2 蛋白进行免疫印迹试验, 结果显示制备的单克隆抗体与纯化的重组蛋白 rHis-Nsp2 有良好的反应性, 在 31.5 ku 处呈现特异性的条带 (图 4); Marc-145 细胞感染 PRRSV 24 h 后, 用获得的单抗进行免疫荧光试验, 结果感染 PRRSV 的 Marc-145 能检测到

特异性荧光,而未感染病毒的 Marc-145 细胞则不能检测到荧光(图 5)。免疫印迹与免疫荧光试验结果表明,制备的抗 Nsp2 单克隆抗体能识别原核表达的重组蛋白与病毒感染产生的病毒蛋白,具有很好的特异性。单克隆杂交瘤细胞腹水经 IFA、ELISA 以及 WB 测定效价,依次为 1:9 000、1:20 000 和 1:5 000。

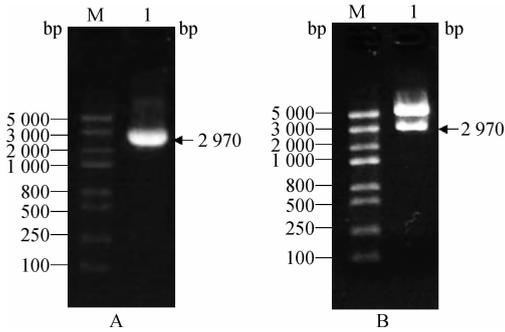


图 3 携带 PRRSV-*nsp2* 的真核表达质粒 pcDNA3-5' Flag-Nsp2 鉴定

M. 5K DNA 相对质量标准; A-1. *nsp2* PCR 产物; B-1. *Bam*H I、*Xba* I 酶切产物

M. 5K DNA marker; A-1. PCR product of *nsp2* fragment amplified from PRRSV cDNA; B-1. The PCR product digested by *Bam*H I and *Xba* I from pcDNA3-5' Flag-Nsp2

图 3 携带 PRRSV-*nsp2* 的真核表达质粒 pcDNA3-5' Flag-Nsp2 鉴定

Fig. 3 Identification of the eukaryotic recombinant plasmid containing PRRSV-*nsp2* (pcDNA3-5' Flag-Nsp2)

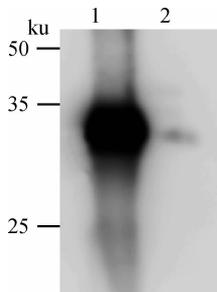


图 4 Nsp2 单克隆抗体的免疫印迹鉴定

1. 重组蛋白 rHis-Nsp2; 2. 未诱导的菌体蛋白

1. The rHis-Nsp2 protein purified from BL21; 2. The lysate of rHis-Nsp2-expressing BL21 induced without IPTG

图 4 Nsp2 单克隆抗体的免疫印迹鉴定

Fig. 4 Reactivity of mAb against purified recombinant protein Nsp2

2.5 Flag-Nsp2 融合蛋白的真核表达和亚细胞定位

重组质粒 pcDNA3-Nsp2 转染后 24 h, HEK293 (图 6A) 与 Marc-145 (图 6B) 细胞均有 Nsp2 表达, 且定位于细胞质中。免疫印迹分析结果表明, 小鼠抗 Nsp2 单克隆抗体可以检测到 Nsp2 在 HEK293

的表达, 呈 120 与 50 ku 2 条特异蛋白条带(图 7); 免疫印迹试验在 Marc-145 细胞中未检测到 Nsp2 特异条带, 可能是 Marc-145 细胞转染效率和重组蛋白表达水平比 HEK293 细胞低的原因。

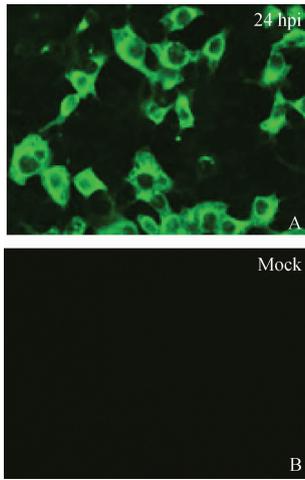
2.6 Nsp2 在感染 Marc-145 细胞中的定位与基因表达分析

为研究 Nsp2 在病毒感染细胞中的表达特点, 分别在 PRRSV 感染 Marc-145 细胞 4、6、8、10 和 12 h 后收集样品, 用小鼠抗 Nsp2 单克隆抗体作为一抗, 进行间接免疫荧光试验。结果表明, 全病毒感染细胞中的 Nsp2 也定位于细胞质内, 与真核转染表达结果一致。感染 4 h 时特异性的小荧光点(Nsp2) 出现在细胞核周围; 随着感染时间的延长, Nsp2 表达逐渐增多, 沿核周向整个细胞质逐渐分散, 感染病毒 12 h 后 Nsp2 表达显著增多(图 8), PRRSV 的感染细胞数也逐渐增多。PRRSV 感染 4 h IFA 可检测到 Nsp2 表达, 12 h 才能检测到结构蛋白 N 的表达, 说明 Nsp2 是病毒感染早期复制蛋白, 在病毒感染早期发挥其病毒复制等相关功能。

免疫印迹试验结果显示 PRRSV 感染 6 h 前可能由于病毒复制早期 Nsp2 蛋白表达量较低, 不能检测到 Nsp2; 感染 8 h 后可检测到 120 ku 左右的 Nsp2 大分子条带, 感染 10 h 后表达量增加, 并且可检测到相对分子质量较小(80、70 与 50 ku 左右)的条带, 12 h 小分子条带更加明显; 感染至 24~36 h 相对分子质量在 50~120 ku 的 Nsp2 蛋白片段大量增加, 甚至可见 35 ku 左右的 Nsp2 小分子条带(图 9)。免疫印迹试验结果表明 PRRSV 在复制过程中出现不同大小的 Nsp2 亚类, 它们共享含 PL2 区域的 277 个氨基酸的 N 端, 这种表达特点很可能与该蛋白介导 PRRSV 的复制功能相适应。

3 讨论

PRRSV 基因变异是一种多位点的积累效应, *nsp2* 基因的变异包括缺失、置换以及插入等, 可能是开发 PRRSV 标记疫苗的重要候选区域^[10]。本研究用特异性的单克隆抗体对 Nsp2 蛋白表达与定位研究发现, 瞬时转染的 Nsp2 可在 Marc-145 和 HEK293 细胞中表达, 且均匀分布于细胞质中; 在 PRRSV 感染的 Marc-145 中, 感染早期 Nsp2 呈点状分布于细胞核周, 随时间延长均匀分布于整个细胞质。PSSRV 感染后出现明显细胞病变的时间约为 12 h, Nsp2 是 PRRSV 感染细胞后最早复制的蛋

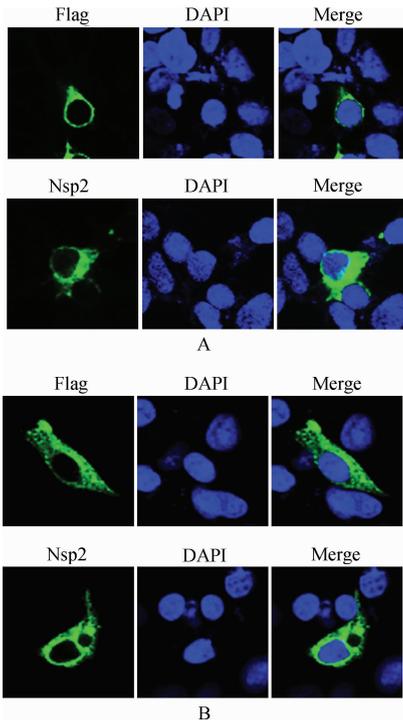


A. PRRSV 感染的 Marc-145 细胞;B. 未感染 PRRSV 的 Marc-145 细胞

A. Marc-145 cells infected with PRRSV at 24 h post-infection; B. Mock

图 5 Nsp2 单克隆抗体的间接免疫荧光鉴定

Fig. 5 Immunofluorescent analysis of Nsp2 mAb IFA staining of PRRSV-infected cells using Nsp2 mAb

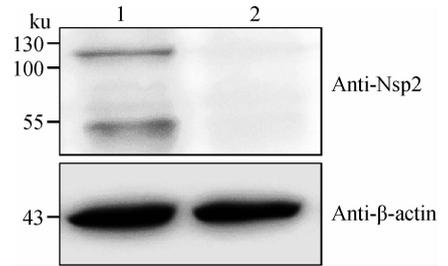


A. Flag 与 Nsp2 抗体检测 Nsp2 在 HEK293 细胞的表达;B. Flag 与 Nsp2 抗体检测 Nsp2 在 Marc-145 细胞的表达

A. Nsp2 expression in HEK293 cells probed with anti-Nsp2 and anti-Flag antibodies; B. Nsp2 expression in Marc-145 cells probed with anti-Nsp2 and anti-Flag antibodies

图 6 Nsp2 在 HEK293 和 Marc-145 细胞中的亚细胞定位 (352×)

Fig. 6 Subcellular localization of Nsp2 in HEK293 and Marc-145 cells(352×)



1. 重组真核表达质粒;2. 空载体对照

1. pcDNA3-5'Flag-Nsp2; 2. pcDNA3-5'Flag

图 7 Nsp2 在 HEK293 细胞中表达的免疫印迹分析

Fig. 7 Detection of Nsp2 in pcDNA3-5'Flag-Nsp2 transfected HEK293 cells

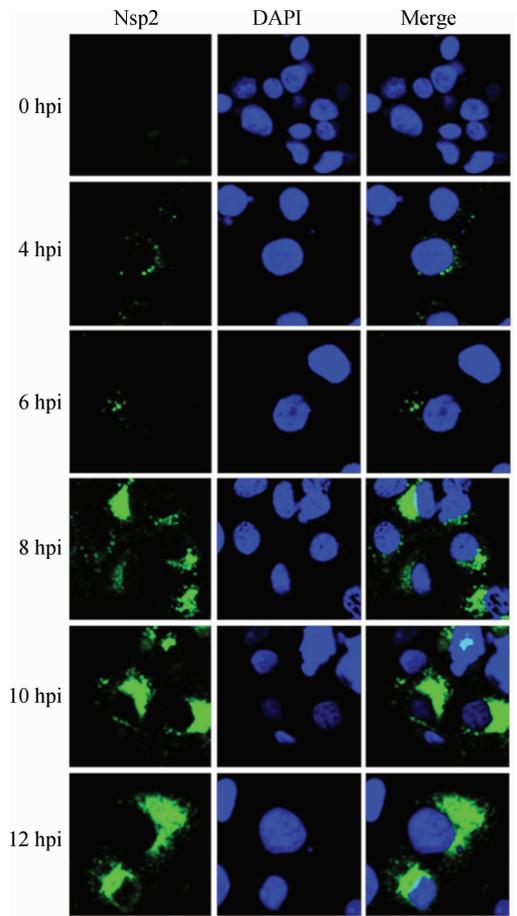


图 8 PRRSV 感染 Marc-145 中 Nsp2 蛋白时相表达的间接免疫荧光分析 (400×)

Fig. 8 Expression patterns of Nsp2 in PRRSV infected Marc-145 cells at different time points by IFA (400×)

白之一。有学者通过 IFA 试验发现 PRRSV 病毒感染早期 Nsp1β、Nsp2、Nsp4、Nsp7α、Nsp7β、Nsp8 定位于细胞核周,原位标记显示它们共定位的位置为病毒 RNA 复制场所^[11]。

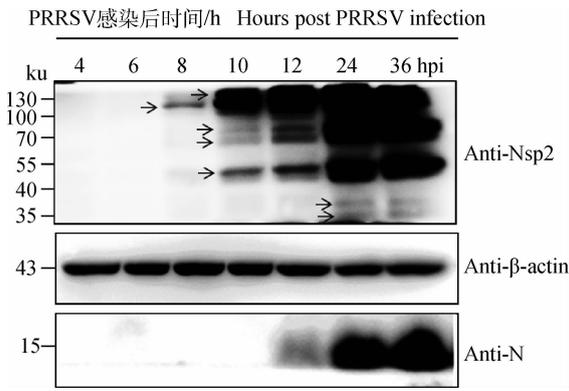


图9 PRRSV感染 Marc-145 不同时间点 Nsp2 的 Western blotting 分析

Fig. 9 Expression analysis of Nsp2 by Western blotting in PRRSV-infected Marc-145 cells at different time points

用 Nsp2 单克隆抗体检测瞬时转染 Nsp2 的 HEK293 细胞,免疫印迹可以检测到约为 120 与 50 ku 两个蛋白条带,可能与 Nsp2 的顺式裂解活性有关;而 PRRSV 感染的 Marc-145 细胞可以检测到 7 条蛋白条带。造成这种差异的原因可能是全病毒感染条件下,Nsp2 的裂解在其它病毒蛋白或宿主相关蛋白的共同参与下完成。J. Han 等采用标记的重组 PRRSV 病毒(北美洲型 VR2332)与特异性单克隆抗体分析了 Nsp2 的蛋白裂解产物,提出 Nsp2 可能存在 6 个不同的亚类:Nsp2a(120 ku)、Nsp2b(97.3 ku)、Nsp2c(80.6 ku)、Nsp2d(55.6 ku)、Nsp2e(42.8 ku)和 Nsp2f(41.9 ku);进一步构建了 Nsp2 特定位点删除的变异重组病毒株(Δ 543-632、 Δ 633-726 和 Δ 727-813)与包含 Nsp2 特定位点(aa12-813,aa12-981)的真核表达质粒,利用 Myc 标签抗体进行免疫印迹试验发现:这些 Nsp2 亚类分享了相同的 N 端,而具有不同的 C 端^[5],Y. Li 等利用 Nsp2 特异性抗体对欧洲型毒株 SD01-08 感染的 Marc-145 细胞裂解液进行放射免疫分析,也同样发现多个不同相对分子质量的蛋白条带^[11]。相似的现象出现在本研究中,PRRSV 感染 Marc-145 细胞的免疫印迹结果清晰显示了一组特异的相对分子质量大小不一样的蛋白条带,其中 5 条 Nsp2(130、120、80、70、50 ku,图 9 箭头所指)片段清晰可见,这些条带很可能是 PRRSV 的 Nsp2 裂解产物;另外 35 ku 附近的 2 条最小分子量的蛋白条带,推测也是 Nsp2 的裂解产物。本次研究使用 PRRSV 临床分离毒株属于美洲型亚型 II 毒株^[2],免疫印迹显示

的条带在 120、80、70、50、35 ku 左右,与 J. Han 等使用美洲型亚型 I 毒株(VR2332)的 6 个 Nsp2 亚类的相对分子质量存在一些差异。造成这些差异可能是由于试验所用的不同毒株有关,因为 PRRSV 在进化过程中 Nsp2 是变异最大的区域之一;而且 J. Han 等使用的是带 HA 与 Myc 标签的重组病毒^[5],标签的插入很可能导致 Nsp2 相对分子质量与电泳迁移率的改变;另一原因可能是使用的单抗不同,其抗原识别位点不同,而且 PRRSV 可能存在于目前没有发现的裂解机制。Nsp2 不同类型的亚类产生的机制尚未得到全面的解析,本研究利用含 Nsp2 PL2 区域 277 个氨基酸的重组蛋白制备的 Nsp2 单抗能特异识别感染 PRRSV 细胞内产生的 Nsp2 蛋白,检测到一组清晰的 Nsp2 条带,提示这组 Nsp2 蛋白可能共享了含 PL2 区域 277 个氨基酸的 N 端。

病毒之所以具有多亚类的蛋白,很可能是病毒以有限的基因获得最大的编码容量,也可能与调节蛋白与蛋白的相互作用或控制蛋白的转运有关,这一机制也出现在单纯疱疹病毒和马动脉炎病毒(EAV)上^[5,12-16]。E. J. Snijder 在对 EAV 的研究中发现,Vero 细胞内 EAV 的 Nsp2(61 ku)被裂解为 18 与 44 ku 的 2 个产物,而在 BHK-21 与 RK-13 细胞内则没有小分子的裂解产物,说明 Nsp2 亚类的产生除了有病毒自身编码的蛋白酶参与,宿主细胞内蛋白酶也可能参与了这一过程^[16]。PRRSV 复制过程中不同分子量的 Nsp2 可能存在不同的功能,感染 10~12 h 以 120 ku 左右大分子 Nsp2 为主,24 h 后 70 与 50 ku 的蛋白量明显增多。这一结果提示,大分子的 Nsp2 可能对病毒感染早期的复制起关键作用。本试验结果为深入研究 PRRSV-Nsp2 蛋白的生物学功能提供了一定基础。

参考文献:

- [1] DARWICH L, GIMENO M, SIBILA M, et al. Genetic and immunobiological diversities of porcine reproductive and respiratory syndrome genotype I strains [J]. *Vet Microbiol*, 2011, 150: 49-62.
- [2] HU H, LI X, ZHANG Z, et al. Porcine reproductive and respiratory syndrome viruses predominant in southeastern China from 2004 to 2007 were from a common source and underwent further divergence [J]. *Arch Virol*, 2009, 154: 391-398.
- [3] ZHOU L, YANG H. Porcine reproductive and re-

- spiratory syndrome in China [J]. *Virus Res*, 2010, 154 : 31-37.
- [4] MUSIC N, GAGNON C A. The role of porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) virus structural and non-structural proteins in virus pathogenesis [J]. *Anim Health Res Rev*, 2010, 11: 135-163.
- [5] HAN J, RUTHERFORD M S, FAABERG K S. Proteolytic products of the porcine reproductive and respiratory syndrome virus nsp2 replicase protein [J]. *J Virol*, 2010, 84: 10102-10112.
- [6] HAN J, RUTHERFORD M S, FAABERG K S. The porcine reproductive and respiratory syndrome virus nsp2 cysteine protease domain possesses both trans- and cis-cleavage activities [J]. *J Virol*, 2009, 83: 9449-9463.
- [7] WANG F X, WEN Y J, YANG B C, et al. Role of non-structural protein 2 in the regulation of the replication of the porcine reproductive and respiratory syndrome virus in MARC-145 cells: Effect of gene silencing and over expression [J]. *Vet Microbiol*, 2012, 161:58-65.
- [8] HAN J, LIU G, WANG Y, et al. Identification of nonessential regions of the nsp2 replicase protein of porcine reproductive and respiratory syndrome virus strain VR-2332 for replication in cell culture [J]. *J Virol*, 2007, 81: 9878-9890.
- [9] FANG Y, FANG L, WANG Y, et al. Porcine reproductive and respiratory syndrome virus nonstructural protein 2 contributes to NF-kappaB activation [J]. *Virol J*, 2012, 9: 83.
- [10] KIM D Y, KAISER T J, HORLEN K, et al. Insertion and deletion in a non-essential region of the non-structural protein 2 (nsp2) of porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) virus: effects on virulence and immunogenicity [J]. *Virus Genes*, 2009, 38: 118-128.
- [11] LI Y, TAS A, SNIJDER E J, et al. Identification of porcine reproductive and respiratory syndrome virus ORF1a-encoded non-structural proteins in virus-infected cells [J]. *J Gen Virol*, 2012, 93: 829-839.
- [12] CARTER K L, ROIZMAN B. The promoter and transcriptional unit of a novel herpes simplex virus 1 alpha gene are contained in, and encode a protein in frame with, the open reading frame of the alpha 22 gene [J]. *J Virol*, 1996, 70: 172-178.
- [13] LIU F Y, ROIZMAN B. The herpes simplex virus 1 gene encoding a protease also contains within its coding domain the gene encoding the more abundant substrate [J]. *J Virol*, 1991, 65:5149-5156.
- [14] LIU F Y, ROIZMAN B. The promoter, transcriptional unit, and coding sequence of herpes simplex virus 1 family 35 proteins are contained within and in frame with the UL26 open reading frame [J]. *J Virol*, 1991, 65: 206-212.
- [15] VAN AKEN D, ZEVENHOVEN-DOBBE J, GORBALENYA A E, et al. Proteolytic maturation of replicase polyprotein pp1a by the nsp4 main proteinase is essential for equine arteritis virus replication and includes internal cleavage of nsp7 [J]. *J Gen Virol*, 2006, 87: 3473-3482.
- [16] SNIJDER E J, VAN TOL H, ROOS N, et al. Non-structural proteins 2 and 3 interact to modify host cell membranes during the formation of the arterivirus replication complex [J]. *J Gen Virol*, 2001, 82: 985-994.

(编辑 白永平)