

## 原核高效表达猪繁殖与呼吸综合征病毒核衣壳蛋白的特性及应用

吴国平<sup>1,2</sup>, 郭川<sup>1</sup>, 曹敏杰<sup>3</sup>, 刘冰心<sup>3</sup>, 梁银龙<sup>3</sup>, 苏文金<sup>3\*</sup> (1. 厦门大学 生命科学院, 福建 厦门 361005; 2. 集美大学 水产学院, 福建 厦门 361021; 3. 集美大学 生物工程学院, 福建 厦门 361021)

**摘要:** 从已构建的PRRSV ORF7 重组质粒pUCm-T-ORF7 中用PCR 扩增ORF7 基因亚克隆至表达载体pGEX-4T-3, 构建重组表达质粒pGEX-4T-3-ORF7 并转化大肠杆菌。经SDS-PAGE 及Western blotting 鉴定, 成功表达了谷胱甘肽转移酶(GST)融合的核衣壳蛋白(N), 重组N 蛋白表达量约为菌体总蛋白的35%, 主要以可溶的形式存在, 且能形成同源二聚体。重组N 蛋白经谷胱甘肽凝胶(glutathione sepharose 4B)亲和层析后得到高度纯化, 并将该蛋白作为抗原建立了间接ELISA 检测方法。利用该方法对某猪场76 份猪血清进行检测并将结果与DEXX 公司ELISA 试剂盒检测结果作比较, 2 种方法的总符合率达93.4%, 检测结果之间差异不显著( $P > 0.05$ )。结果表明大肠杆菌表达的重组GST 融合N 蛋白具有良好的抗原性, 因而有望利用该重组蛋白开发为试剂盒应用于临床PRRSV 抗体的检测。

**关键词:** 猪繁殖与呼吸综合征病毒; 核衣壳蛋白; 同源二聚体; 间接ELISA

中图分类号: S852.659 文献标识码: A 文章编号: 1005-4545(2007)02-0150-05

## Characterization and application of nucleocapsid protein of porcine reproductive and respiratory syndrome virus expressed in *E. coli*

WU Guo-ping<sup>1,2</sup>, GUO Chuan<sup>1</sup>, CAO Min-jie<sup>3</sup>, LIU Bing-xin<sup>3</sup>, LIANG Yin-long<sup>3</sup>, SU Wen-jin<sup>3\*</sup>

(1. College of Life Science, Xiamen University, Xiamen, Fujian 361005, China; 2. College of Fisheries, Jimei University, Xiamen, Fujian 361021, China; 3. College of Biotechnology, Jimei University, Xiamen Fujian 361021, China)

**Abstract:** Porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) FJ-1 was a newly identified virus isolate in Fujian province. The ORF7 gene of FJ-1 was amplified by RT-PCR and cloned into vector pUCm-T, then subcloned into expression vector of pGEX-4T-3. The recombinant GST-tagged nucleocapsid protein (nN) was expressed in *E. coli* and the molecular weight was approximately 38 000 as identified by SDS-PAGE and Western blotting. Expression level of the nN protein was approximately 35% of the total bacterial protein and mostly soluble. The nN protein was purified to homogeneity using GST affinity chromatography. A analysis of the nN protein under nonreducing conditions revealed that similar to native protein, the nN protein also possesses homo-dimerization property. An indirect enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for detecting PRRSV antibody was developed using the purified nN protein as antigen. 76 serum samples were detected by the method and the result was compared with that using DEXX PRRS HerdChek ELISA kit. An identity of 93.4% was revealed between the two ELISA kits and no significant difference ( $P > 0.05$ ) was detected. The data indicate the nN protein has the potential usefulness for detection of the PRRSV antibodies.

**Key words:** porcine reproductive and respiratory syndrome virus; nucleocapsid protein; homo-dimerization; indirect ELISA

\* Corresponding author, Tel: 86-592-6180378; E-mail: wjsu@jmu.edu.cn

### 猪繁殖与呼吸综合征病毒 (porcine reproductive and respiratory syndrome virus, PRRSV) 为引起 PRRS 的病原体, 属于动脉炎病毒, 带囊膜的单股正链 RNA 病毒, 基因组全长约 15 kb。根据病毒基因组的差异, PRRSV 可分为 2 个基因型: 欧洲型 (A 型, LV 株为代表株) 和美洲型 (B 型, ATCC-VR2332 株为代表株)<sup>[1]</sup>。PRRSV 含 8 个开放阅读框

收稿日期: 2005-07-08

基金项目: 福建省科技攻关计划重点资助项目 (2003N083); 厦门市科技攻关计划重点资助项目 (3502Z20031054)

作者简介: 吴国平 (1972-), 讲师, 博士。

\* 通讯作者, Tel: 86-592-6180378; E-mail: wjsu@jmu.edu.cn

active and respiratory syndrome virus, PRRSV) 为引起 PRRS 的病原体, 属于动脉炎病毒, 带囊膜的单股正链 RNA 病毒, 基因组全长约 15 kb。根据病毒基因组的差异, PRRSV 可分为 2 个基因型: 欧洲型 (A 型, LV 株为代表株) 和美洲型 (B 型, ATCC-VR2332 株为代表株)<sup>[1]</sup>。PRRSV 含 8 个开放阅读框

(ORFs), ORF1a 和 ORF1b 为编码病毒复制酶基因, ORF2 至 ORF7 均为编码病毒结构蛋白的基因。ORF7 基因位于病毒基因组 3 末端, 编码核衣壳蛋白(N), 组成病毒的核衣壳, 起保护病毒基因组的功能。研究表明, N 蛋白羧基端对维持蛋白正确构型和抗原性具有重要作用, 而氨基端两处由碱性氨基酸残基构成的结构域参与结合病毒 RNA 的功能<sup>[2-4]</sup>。通过研究 PRRSV 感染 Marc-145 等细胞的试验发现, N 蛋白本身具有相互作用的特性, 它可通过非共价键形成同源二聚体甚至多聚体, 转运至内质网和高尔基体后, 在氧化环境下 N 蛋白之间进一步形成分子间二硫键, 稳定已形成的二聚体和多聚体, 并以此为基础逐步装配成核衣壳, 保护病毒粒子<sup>[5-7]</sup>。但是, 迄今为止, 对于利用原核系统表达的 N 蛋白是否与天然蛋白一样具有相互作用并形成寡聚体的特性不甚清楚。由于 N 蛋白具有很强的免疫原性, 在猪感染 PRRSV 或接种 PRRSV 疫苗后, 血清中针对 N 蛋白的抗体出现最早, 且抗体水平高, 持续时间长, 因而 N 蛋白在 PRRS 的诊断上具有很高的应用价值<sup>[8]</sup>。

作者利用 RT-PCR 技术检测确定福建某种猪场发生了 PRRS<sup>[9]</sup>, 并克隆了 FJ-1 ORF7 基因, 测序结果表明 FJ-1 PRRSV 属于美洲型。本研究旨在利用基因工程技术在大肠杆菌中表达谷胱苷肽转移酶(GST)融合的 PRRSV FJ-1 的 ORF7 基因, 对重组 N 蛋白是否具有形成同源二聚体和多聚体的特性作初步研究。同时, 采用谷胱苷肽凝胶进行亲和层析高度分离纯化重组 N 蛋白, 并以此蛋白为抗原建立检测 PRRSV 抗体的间接 ELISA。

## 1 材料与方法

### 1.1 表达载体、菌株和 PRRSV ORF7 基因

pGEX-4T-3 载体购自 Invitrogen 公司, 大肠杆菌 BL 21(DE3) 为本研究室保存。含 PRRSV FJ-1 毒株 ORF7 基因的 pUCm-T-ORF7 重组载体为作者构建, 基因序列已登录 GenBank (A Y669398)。

1.2 血清样品 阳性血清和阴性血清各 10 份由厦门出入境检验检疫局提供。另 76 份血清采自福建某种猪场, 其中 4 月龄仔猪血清 71 份, 母猪血清 4 份, 公猪血清 1 份。仔猪于 30 日龄, 母猪和公猪于采血前 10 个月时均用国产 PRRS 双价灭活疫苗免疫 1 次。

1.3 PRRSV ORF7 基因重组表达载体的构建、筛选与鉴定 用引物 P1(5'-CGCGGATCCATGCCA

AATAACAACGGCAA G-3') 和 P2(5'-ACGCGTCGACTCATGCTGAGGGTGA TGCTGT-3') (下划线表示酶切位点) 从含 pUCm-T-ORF7 重组载体的大肠杆菌中扩增 ORF7 基因。将 BamH I 和 Sal I 双酶切的 ORF7 基因及同样双酶切的 pGEX-4F-3 载体 16 连接过夜。取连接产物按常规方法<sup>[10]</sup>转化 BL 21(DE3) 大肠杆菌感受态细胞, 37 培养过夜, 挑取单菌落进行小量培养, 用载体通用引物进行 PCR 初步筛选阳性菌, 提取阳性菌质粒用 BamH I 和 Sal I 双酶切鉴定。将酶切鉴定阳性菌送上海博亚生物公司测序。pGEX-4T-3 空载体按相同方法转化大肠杆菌并培养。

1.4 重组蛋白的诱导表达与鉴定 经上述鉴定的阳性菌在 3 mL LB 培养基(含 100 mg/L 氨苄青霉素)中 37、250 r/min 摇床培养至  $D_{600}$  约 0.6, 取出 1 mL 作为阴性对照, 余下加入 IPTG 至终浓度为 0.5 mmol/L, 继续在相同条件下诱导 4 h。取菌液 1 mL 离心后按菌液量的 1/10 体积加入 SDS 上样缓冲液重悬菌体, 煮沸 10 min 后进行 SDS-PAGE 和 Western blotting 鉴定重组蛋白。Western blotting 所用的一抗为抗 GST 单克隆抗体或 PRRSV 阳性血清 IgG(经 Protein A Sepharose 亲和层析柱纯化)。未经 IPTG 诱导的菌体蛋白作为对照。

1.5 重组蛋白的亲和层析纯化及形成同源二聚体的鉴定 按上述方法培养 200 mL 阳性菌用于表达重组蛋白。用谷胱苷肽凝胶(Novagen 公司产品)亲和层析纯化重组蛋白, 方法按产品说明书进行。用同样方法纯化空载体表达的 GST 蛋白并保存备用。在还原条件(样品添加二巯基乙醇至 5%)和非还原条件(样品不添加二巯基乙醇)下对纯化蛋白进行 SDS-PAGE 和 Western blotting 分析重组蛋白是否形成同源二聚体。

1.6 间接 ELISA 的建立和田间血清样品的检测 间接 ELISA 检测方法的建立参照 Seuberlich 等<sup>[11]</sup>的方法作适当修改。基本过程为: 纯化的重组 GST-ORF7 蛋白和 GST 蛋白用 pH 9.6 的碳酸盐缓冲液稀释分别包被 96 孔酶标板, 4 过夜或 37 2 h。用已知的阳性血清和阴性血清通过棋盘滴定法, 确定最佳抗原、抗体工作浓度, 其中抗原以 1 600、800、400、200 和 100 ng/孔包被, 作为本底对照, 纯化的 GST 蛋白分别以 1 200、600、300、150 ng/孔包被。抗体用含 1% 脱脂牛奶的 TBST 稀释液以 50、100 倍稀释, 辣根过氧化物酶标记兔抗猪 IgG(丹麦 DA KO 公司)用含 1% 脱脂牛奶的 TBST 稀释液以 1 4 000 倍稀释。抗原包被后用 TBST 洗涤 3 次, 之后用含 5%

脱脂牛奶的TBST于37℃封闭30 min。同上洗涤后加入血清,每孔100 μL,37℃孵育30 min。洗涤后加入酶标记兔抗猪IgG,每孔100 μL,37℃孵育30 min。洗涤后用OPD(Sigma)显色15 min,4 mol/L H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>终止显色反应,于490 nm处测D值。为确定判定标准,每个血清的ΔD<sub>s</sub>(即包被GST-ORF7抗原孔D值减去包被GST抗原孔D值)用下式计算其反应的百分比:反应率(R)=100×[(血清样本ΔD<sub>s</sub>)-(阴性血清ΔD<sub>s</sub>)]/[(阳性血清ΔD<sub>s</sub>)-(阴性血清ΔD<sub>s</sub>)]<sup>[11]</sup>。

用上述确定的最佳条件检测田间血清样品76份,检测时每块酶标板上均用已知阳性血清和阴性血清各一份作为对照。对本试验方法检测结果与DEXX公司的ELISA诊断试剂盒检测结果作比较分析。2种方法检测结果的阳性和阴性血清样本符合总数占总被检血清样本的比例即为两者的总符合率。

为检验本方法的稳定性,用上述确定的最佳抗原包被浓度包被96孔酶标板,经洗涤、控干后于4℃放置,用上述已知阳性血清和阴性血清进行定期检测,每月1次,共检测3次,检验包被抗原在贮藏过程中的稳定性。

## 2 结果

**2.1 重组表达载体的构建和筛选** 经PCR扩增出完整ORF7基因,经双酶切后与双酶切的表达载体pGEX-4T-3连接并转化大肠杆菌BL21(DE3)。重组菌首先进行PCR筛选,提取初步筛选的阳性菌质粒经BamHI和SalI双酶切,酶切后出现1条约380 bp的目的片段(图1);重组质粒经测序,结果表明构建

的表达载体开放阅读框和序列完全正确。

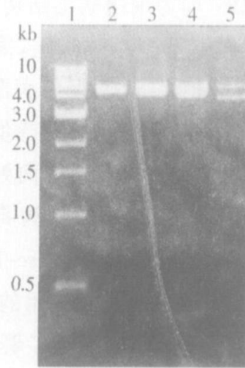


图1 重组质粒的双酶切鉴定 1.1 kb DNA Marker; 2~4 BamHI和SalI双酶切重组质粒pGEX-4T-3-ORF7; 5. 未酶切的重组质粒pGEX-4T-3-ORF7

### 2.2 SDS-PAGE和Western blotting鉴定重组蛋白

阳性菌经IPTG诱导,并与未诱导阳性菌在SDS-PAGE电泳后比较发现,在约38 000处出现1条明显的特异性蛋白条带,与预期融合N蛋白大小一致,证明重组蛋白在大肠杆菌中得到表达(图2A)。凝胶成像扫描分析SDS-PAGE中蛋白水平,重组蛋白约为菌体总蛋白的35%。

用抗GST单克隆抗体进行Western blotting分析在约38 000处出现1条明显蛋白条带,在约75 000处存在的另一条微弱的蛋白条带推测为重组蛋白的同源二聚体(图2B)。用Protein A Sepharose(Pharmacia公司产品)纯化的PRRSV阳性血清IgG进行Western blotting所得结果与上图相似(图略)。以上试验证明表达的重组蛋白为GST融合的PRRSV N蛋白。

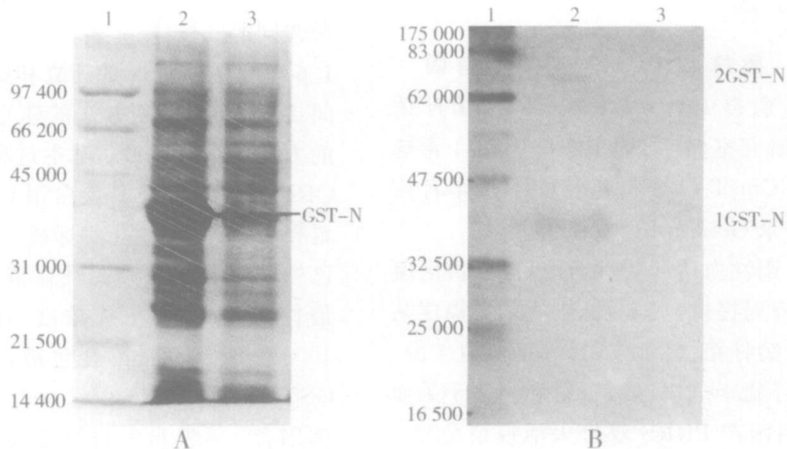


图2 重组pGEX-4T-3-ORF7在大肠杆菌中表达N蛋白的鉴定分析 A.SDS-PAGE;B.Western blotting. 1. 标准蛋白分子量; 2. IPTG诱导的总菌体蛋白; 3. 未诱导的总菌体蛋白

**2.3 蛋白的亲层析纯化及形成同源二聚体的鉴定** 经中量培养(20 mL)、诱导后发现重组蛋白主要(80%左右)以可溶的形式存在,因而为利用谷胱苷肽凝胶亲和层析法一步高度分离纯化重组蛋白打下了基础。重组蛋白的纯化在非还原条件下进行。在非还原条件和还原条件下进行SDS-PAGE电泳时发现非还原条件下存在2条目的蛋白带,相对分子质量为38 000和75 000,约为重组N蛋白的1倍和2

倍,推测为重组N蛋白的单体和二聚体;而还原条件下只有1条38 000的目的蛋白带。此外,在SDS-PAGE上还存在另一条相对分子质量约28 000的蛋白条带,推测为重组N蛋白的降解产物(图3A)。Western blotting分析结果出现相似的现象(图3B)。由于纯化的GST蛋白本身不能形成同源二聚体,提示重组N蛋白形成二聚体的特性为PRRSV N蛋白本身所具有的特性。

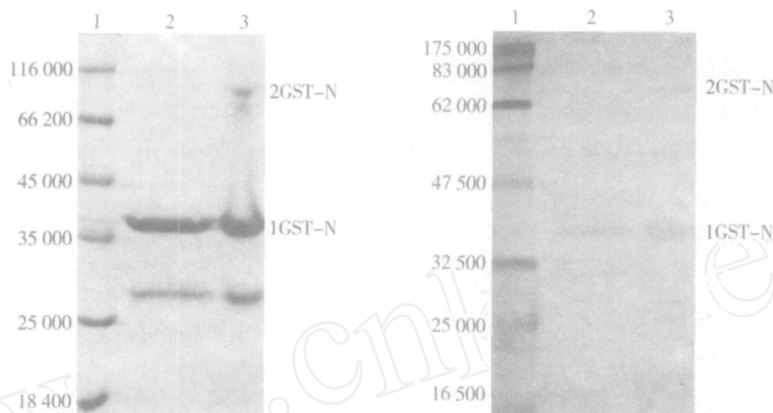


图3 重组N蛋白纯化后鉴定分析 A.SDS-PAGE;B.Western blotting。1. 标准蛋白分子量;2. 添加 $\beta$ 巯基乙醇的重组N蛋白;3. 未添加 $\beta$ 巯基乙醇的重组N蛋白

#### 2.4 间接ELISA的建立及田间血清样品的检测

对间接ELISA条件优化结果表明,当本底对照GST蛋白300 ng/孔,抗原为400 ng/孔,血清1:100稀释,辣根过氧化物酶标记兔抗猪IgG 1:4 000时反应条件最佳。以下试验均采用该条件进行。对已知的各10份阳性血清和阴性血清检测的R值分别在28%~150%和15%~20%。以此判断R大于28%为抗体阳性血清,R小于20%为抗体阴性血清,介于20%~28%为抗体阳性可疑血清。

根据上述R值判断标准,检测76份田间血清样品结果为:仔猪血清54份阳性,13份阴性和4份可疑;母猪血清阴性3份,阳性1份;1份公猪血清为可疑。DEXX公司的ELISA诊断试剂盒检测结果为仔猪血清57份阳性,14份阴性;母猪血清阴性3份,阳性1份;公猪血清1份为阳性。2种方法的阳性符合率为93.2%,阴性符合率为94.1%,总符合率为93.4%。从检测结果可知,PRRS灭活疫苗免疫仔猪3个月后抗体阳性率约为80%左右,母猪免疫10个月后抗体阳性率仅为25%。

该检测方法的稳定性试验结果表明,包被抗原的ELISA板在4℃放置3个月后,阳性样品数值平均上升5%,阴性样品数值平均也上升约2%。经统计学

分析,与4℃放置前检测结果没有显著差异,不影响结果的判断,从而表明该间接ELISA于4℃放置至少可保存3个月。

### 3 讨论

目前,PRRSV基因型可分为欧洲型和美洲型,我国主要流行美洲型毒株,福建省近年PRRSV阳性率也很高<sup>[12-13]</sup>。本研究以作者最近分离的福建省PRRS美洲型病毒FJ-1为材料,成功构建了表达载体pGEX-4T-3-ORF7,并在BL21(DE3)中高水平地表达了重组蛋白,表达量占菌体总蛋白的35%左右,用GST单克隆抗体和PRRSV阳性血清IgG进行Western blotting证实表达产物为GST融合的PRRSV N蛋白。经优化诱导条件,表达的重组N蛋白80%左右以可溶的形式存在。在非变性条件下,采用谷胱苷肽凝胶亲和层析高度纯化了可溶的重组N蛋白,为研究重组蛋白的特性和建立间接ELISA检测试剂打下了基础。

研究发现<sup>[5-7]</sup>,PRRSV N蛋白具有形成寡聚体的特性,在感染PRRSV的细胞中合成病毒N蛋白,N蛋白首先通过非共价键相互作用,形成同源二聚体,在此基础上继续与N蛋白单体结合形成多聚体;

转运进入细胞内质网和高尔基体的N 蛋白单体和多聚体,在氧化环境下由位于23 氨基酸残基处的半胱氨酸形成分子间的二硫键,稳定已形成的寡聚体,在此基础上逐步组成病毒核衣壳,保护病毒基因组和病毒粒子。本研究对原核表达的GST 融合N 蛋白,在非还原条件下对未经纯化的重组蛋白做Western blotting,发现存在2 条相对分子质量约为融合蛋白1 倍和2 倍的蛋白条带产生免疫交叉反应,推测可能是重组蛋白形成了同源二聚体。对纯化后的重组蛋白进一步研究证实在原核系统表达的重组蛋白能形成同源二聚体。由于纯化的GST 蛋白本身不能形成同源二聚体,因而重组蛋白形成同源二聚体的特性是PRRSV N 蛋白具有的特性,且这种特性在重组蛋白中仍然保留,说明PRRSV N 蛋白形成同源二聚体甚至寡聚体是其本身固有的特性,有利于自身组装成病毒核衣壳。由于表达的GST 融合N 蛋白可溶,经酶切除GST 后的N 蛋白有可能用于蛋白的结构和功能研究。

采用纯化的蛋白作抗原建立的间接ELISA,抗原包被的最佳量约为400 ng/孔(对应的本底对照GST 蛋白包被量约为300 ng/孔),对检测的76 份猪血清,与DEXX 公司的试剂盒相比有93.4% 的符合率<sup>[14]</sup>,表明利用大肠杆菌表达的GST 融合重组N 蛋白具有良好的抗原性,建立的间接ELISA 稳定、敏感、特异,结合原核系统表达抗原具有方便、稳定、价廉等特点,因而本研究有望利用该重组蛋白开发试剂盒应用于临床PRRSV 抗体的检测。

#### 参考文献:

- [1] Murtaugh M P, Elam N R, Kakach L T. Comparison of the structural protein coding sequences of the VR-2332 and LV virus strains of the PRRS virus [J]. *Arch Virology*, 1995, 140: 1451-1460
- [2] Wootton S, Koljesar G, Yang L, et al. Antigenic importance of the carboxy-terminal beta-strand of the porcine reproductive and respiratory syndrome virus nucleocapsid protein [J]. *Clin Diagn Lab Immunol*, 2001, 8: 598-603
- [3] Meulenberg J J M, Nieuwstadt A P, Essen-Zandbergen A, et al. Localization and fine mapping of antigenic sites of the nucleocapsid protein of porcine reproductive and respiratory syndrome virus with monoclonal antibodies [J]. *Virology*, 1998, 252: 106-114
- [4] Dagainakatte G C, Kapil S. Mapping of the RNA-binding domain of the porcine reproductive and respiratory syndrome virus nucleocapsid protein [J]. *Adv Exp Med Biol*, 2001, 494: 547-552
- [5] Mardassi H, Massie B, Dea S. Intracellular synthesis, processing, and transport of proteins encoded by ORFs 5 to 7 of porcine reproductive and respiratory syndrome virus [J]. *Virology*, 1996, 221: 98-112
- [6] DePutte 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 heparin like receptor on porcine alveolar macrophages [J]. *J Virology*, 2002, 76(9): 4312-4320
- [7] Wootton S K, Dongwan Y. Homooligomerization of the porcine reproductive and respiratory syndrome virus nucleocapsid protein and the role of disulfide linkages [J]. *J Virology*, 2003, 77(8): 4546-4557
- [8] Dea S, Wilson L, Therrien D, et al. Competitive ELISA for detection of antibodies to porcine reproductive and respiratory syndrome virus using recombinant *E. coli*-expressed nucleocapsid protein as antigen [J]. *J Virology Methods*, 2000, 87: 109-122
- [9] 吴国平, 郭川, 曹敏杰, 等. RT-PCR 快速检测猪繁殖和呼吸综合征临床组织样品的研究 [J]. *动物医学进展*, 2004, 25(6): 78-80
- [10] 萨姆布鲁克 J, 拉塞尔 D W. 分子克隆实验指南 [M]. 3 版. 黄培堂, 译. 北京: 科学出版社, 2002
- [11] Seuberlich T, Tratschin J D, Thur B, et al. Nucleocapsid protein-based enzyme-linked immunosorbent assay for detection and differentiation of antibodies against European and north American porcine reproductive and respiratory syndrome virus [J]. *Clin Diagn Lab Immunol*, 2002, 9(6): 1183-1191
- [12] 周艳君, 董光志, 薛强, 等. 猪繁殖与呼吸综合征病毒CH-1a 株核衣壳蛋白基因在原核系统中的高效表达与初步应用 [J]. *中国预防兽医学报*, 2002, 24(6): 401-404
- [13] 杨小燕, 李晓华, 沈绍新, 等. 猪繁殖与呼吸综合征的血清学调查 [J]. *中国兽医杂志*, 2001, 37(4): 17-18
- [14] 吴延功, 徐天刚, 王志亮, 等. 重组N 蛋白抗原检测PRRSV 抗体ELISA 的研究 II. 试剂盒阴阳性临界值的测定及其与DEXX 公司试剂盒的比较 [J]. *中国兽医学报*, 2006, 26(2): 117-121