

猪繁殖与呼吸综合征病毒 *ORF5* 基因在昆虫细胞中的高效融合表达*

方六荣 肖少波 牛传双 张 辉 陈焕春**

(华中农业大学牧医学院动物病毒室 武汉 430070)

摘 要:对杆状病毒 Bac-to-Bac 表达系统的转座质粒 pFastbac1 进行改造, 即在其多角体蛋白启动子下游插入谷胱甘肽-S-转移酶(glutathione-S-transferase, GST)基因, 构建 GST 融合表达转座质粒 pFGST。通过转座和转染 S9 细胞, 证实该系统能高水平表达 GST。采用 PCR 方法从 pMT-gp51 质粒中扩增截去 N 端信号肽序列的猪繁殖与呼吸综合征病毒(PRRSV)YA 株 *ORF5* 基因, 并将截短的 *ORF5* 基因片段克隆到 pFGST 中, 使之与 GST 融合, 构建的重组转座质粒 pFGST-53 转染 DH10Bac, 提取大分子 Bacmid DNA, 转染 S9 细胞, 获得能表达融合蛋白的高滴度重组病毒 rvGST53。rvGST53 感染 S9 细胞, SDS-PAGE 和 Western 印迹分析表明: 与 GST 融合的 *ORF5* 基因在 S9 细胞中获得高效表达, 表达产物分子量为 45kD, 能与抗 PRRSV E 蛋白单克隆抗体发生特异性反应。将表达产物免疫小白鼠, 经间接免疫荧光检测, 免疫血清能使 PRRSV YA 株感染的 MARC-145 细胞呈较强的荧光着色, 证实表达的融合蛋白具有良好的免疫原性。

关键词:猪繁殖与呼吸综合征病毒(PRRSV), *ORF5* 基因, GST 融合表达, 免疫原性

中图分类号 S850 文献标识码: A 文章编号 0001-6209(2003)01-0008-07

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)引起的一种严重危害养猪业的新传染病^[1]。临床上以妊娠母猪流产、死胎、木乃伊胎、弱仔等繁殖障碍以及仔猪的呼吸道症状和高死亡率为特征。最初由于不知其病原被称为“神秘病”。该病自 1987 年首次在美国发现以来, 随后, 加拿大和欧洲一些国家也相继报道了该病的发生, 几年之内便席卷了北美洲和欧洲大陆, 现已蔓延至许多亚太国家和地区^[2]。尽管我国 1995 年才首次暴发此病, 但根据临床和血清学调查, 该病在我国普遍存在, 而且近年来还呈流行态势^[3]。

PRRSV 属动脉炎病毒科, 系单股正链 RNA 病毒, 基因组大小为 15kb, 包括 8 个开放阅读框架, 可编码 6 种结构蛋白和 2 种非结构蛋白, 其中 *ORF5* 编码病毒的糖基化包膜蛋白(又称 E 蛋白和 gp5), 是主要的结构蛋白, 也是一种多功能蛋白, 参与细胞免疫与体液免疫^[4,5], 是发展新型疫苗的良好目标基因。最近, 又有研究表明 PRRSV 感染的康复猪血清中针对 gp5 的抗体滴度与中和病毒的能力呈显著相关性^[6], 这一方面进一步证实了 gp5 在诱发免疫保护方面发挥重要作用, 另一方面也为发展能直接反映机体免疫状况的新型

* 国家高技术研究发展计划 863 项目(2001AA213051)和武汉市青碾科技晨光计划项目(20025001041)

** 通讯作者, E-mail: hzauvet@public.wh.hb.cn

作者简介: 方六荣(1969-)女, 湖北咸宁人, 博士, 副教授, 主要从事动物微生物与免疫学研究。

收稿日期: 2002-05-23, 修回日期: 2002-09-21

诊断试剂提供了新的思路。本研究通过对目前广泛应用的杆状病毒 Bac-to-Bac 表达系统进行改造,建立了能简便、快速获得与 GST 融合表达的重组杆状病毒的表达系统,并通过这一改造的系统使 PRRSV ORF5 基因在昆虫细胞中获得高效融合表达,为深入研究 ORF5 基因的功能以及研制 PRRSV 的新型疫苗与诊断试剂奠定了基础。

1 材料和方法

1.1 毒株、质粒、菌株与细胞

PRRSV YA 株系本实验室从发病猪中分离的高致病力野毒株,由本室保存。质粒 pGEX-KG,含谷胱甘肽-S-转移酶(Glutathione-S-Transferase, GST)基因全长 cDNA 以及修饰的 Thrombin 识别与切割序列^[7],由华中农业大学生命科学院张忠明教授惠赠。质粒 pMT-gp51,含 PRRSV YA 株 ORF5 基因完整编码区,由作者构建并保存。杆状病毒 Bac-to-Bac 表达系统(包括转座质粒 pFastBac1、DH₁₀Bac 受体菌)购自 GIBCO BRL 公司。MARC-145 细胞由德国巴伐利亚动物保健中心 Czerny 博士赠送。昆虫细胞 Sf9、大肠杆菌 DH₅α 均由本室保存。

1.2 工具酶与试剂

各种限制性内切酶均为 MBI 公司产品;T4 DNA 连接酶、脂质体转染试剂盒 Lipfectin2000、Grace's 昆虫细胞培养基、胎牛血清均为 GIBCO BRL 公司产品;DNA 快速回收试剂盒购自北京原平皓生物技术公司;针对 PRRSV E 蛋白(gp5)的单抗 ISU25-Cl^[8]由美国 Iowa 大学 Platt 教授惠赠。HRP、FITC 标记的羊抗鼠 IgG 均为 SBA 公司产品;针对 HRP 标记二抗的化学发光底物 SuperSignal West Pico Chemiluminescent Substrate 为 Pierce 公司产品。

1.3 引物设计与 PCR 扩增

引物 pG1 和 pG2,可扩增 GST 基因全长 cDNA、Thrombin 识别与切割位点及部分多克隆位点(约 750bp),上下游引物两端分别设计 *Bgl*II 和 *Sal*I 位点;引物 p531 和 p532,可扩增截去 N 端信号肽序列的 PRRSV YA 株 ORF5 基因(约 540bp),上下游引物两端分别设计 *Eco*RI 和 *Xba*I 位点;上述引物均由上海生工生物工程公司合成。引物序列分别为:

pG1 5'—GGCAGATCTGTATTCATGTCCCCTATACTA—3'

pG2 5'—CTCGAGTCGACCCATGGAGTCTAG—3'

p531 5'—GAAGAATTCCTGTGCTCGTCATCAACGCC—3'

p532 5'—TTTTCTAGAGACGACCCCATTTGCCG—3'

GST 的扩增条件为 95℃ 5min 变性后进入循环,循环参数为 95℃ 1 min,55℃ 1 min,72℃ 1 min,35 个循环后 72℃ 延伸 10 min。

ORF5 基因的扩增条件为 95℃ 5 min 变性后进入循环,循环参数为 95℃ 1 min,58℃ 1 min,72℃ 1 min,35 个循环后 72℃ 延伸 10 min。

1.4 DNA 重组技术

酶切、连接、转化、质粒提取等,均按常规分子生物学方法操作^[9]。

1.5 重组杆状病毒的获得

质粒的转座、DH₁₀Bac 目的菌落的筛选与纯化、Bacmid DNA 的提取、转染、重组病毒的扩增与空斑滴定等,均按 GIBCO BRL 公司 Bac-to-Bac 表达系统操作手册进行。

1.6 PCR 检测外源基因在重组病毒中整合

按文献 [10] 所述的方法制备 PCR 模板。对于仅表达 GST 的重组杆状病毒,用 pG1 和 pG2 对 GST cDNA 进行扩增。对于表达 GST 与 ORF5 融合蛋白的重组杆状病毒,除采用 p531 和 p532 扩增 ORF5 cDNA 外,还采用 pG1 和 p532 扩增 GST-ORF5 融合基因,扩增条件为 95℃ 5 min 变性后进入循环,循环参数为 95℃ 1 min, 58℃ 1 min, 72℃ 2 min, 35 个循环后 72℃ 延伸 10 min。

1.7 重组病毒的扩繁与表达检测

扩繁病毒时,以 0.1 pfu 的重组病毒接种 Sf9 细胞,48h 收集上清,并避光保存在 -70℃ 备用。表达检测时,以 5~8 pfu 的重组病毒接种长至 70%~80% 融合的 Sf9 细胞,27℃ 培养 72h 后,用 PBS (pH 7.4) 漂洗细胞一次,收集细胞,加适量昆虫细胞裂解液,再与等量的 2 倍 SDS-PAGE 上样缓冲液混合,沸水浴 5 min 变性后,进行 SDS-PAGE。

1.8 表达产物的 Western 印迹分析

将 SDS-PAGE 的蛋白带转移至硝酸纤维素膜,用含 1% BSA 的 TBST 封闭,以 E 蛋白 (gp5) 的单抗 ISU25-C1 作为一抗,HRP 标记的羊抗鼠 IgG 为二抗,化学发光检测试剂盒检测。

1.9 融合蛋白的抗原性检测

收集大量表达融合蛋白的细胞,用 PBS (pH 7.4) 洗涤 2 次,反复冻融 3 次,超声波破碎后经腹腔注射免疫 4 只健康昆明鼠(约 20 μg 抗原/只),每 2 周免疫一次,于第 2 次免疫后 2 周采血并分离血清,置 -20℃ 备用。

接种 MARC-145 细胞于 6 孔板,待长至单层后,以 0.1 pfu 的 PRRSV YA 株感染。待细胞出现病变后,用 PBS (pH 7.4) 洗涤 2 次,甲醇固定 20 min,用含 10% 胎牛血清的 PBS 封闭 30 min, PBS 洗涤 2 次,与免疫鼠血清(1:40 稀释)作用 1h, PBS 洗涤 2 次后与 FITC 标记的羊抗鼠 IgG 作用 1h,再经 PBS 洗涤 3 次后直接置于倒置荧光显微镜 (Olympus, IX70) 下观察荧光。同时设重组病毒 rvBacGST 免疫鼠血清作对照。

2 结果

2.1 转座质粒 pFGST 的构建

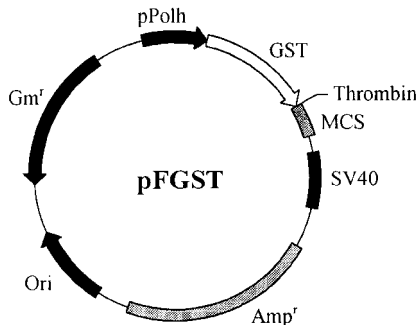


图 1 转座质粒 pFGST 结构图

Fig.1 The map of plasmid pFGST

以 pGEX-KG 为模板, pG1、pG2 为引物, PCR 扩增出约 0.75 kb 左右的片段(图略), 扩增产物经 *Bgl*II 和 *Sal*I 酶切后克隆到 pFastBac1 的 *Bam*HI 与 *Sal*I 位点之间, 重组质粒命名为 pFGST(结构图见图 1)。该转座质粒含有 GST 编码序列、具有更高效率的 Thrombin 切割识别序列^[7]以及 16 个可被利用的单一限制性酶切位点。

2.2 表达 GST 的重组病毒的获得与表达检测

pFGST 转化 DH10Bac 感受态, 48h 后可见四环素-卡那霉素-庆大霉素三抗平皿(含 X-gal 和 IPTG) 上有大量单个蓝白菌落生长, 挑取菌落形态较大的白斑划

线纯化一次,并通过 PCR 鉴定,然后选择 PCR 鉴定为阳性的菌接种适量三抗液体培养基,提取 Bacmid,电泳显示 Bacmid DNA 完整。在脂质体介导下,将其转染 Sf9 细胞,约 72h 后可观察到细胞病变、细胞变圆肿大、折光性明显增强,正常细胞则没有这种变化。

提取重组病毒 DNA 进行 PCR 扩增,电泳可见在 0.75kb 处出现特异性扩增条带,与阳性对照一致,而阴性对照没有特异性带出现(图略),说明 GST 基因已整合到重组病毒中,因此所获得的重组病毒为目的病毒,将其命名为 rvBacGST。rvBacGST 以 5~8pfu 量感染 Sf9 细胞,72h 后收集细胞,SDS-PAGE 检测可见重组病毒感染的细胞在大约 27kD 处出现一条特异性条带(图略),与预期的大小相当,说明 GST 在 Sf9 中获得正确表达。

2.3 GST-ORF5 融合基因转座质粒的构建

以 pMT-gp51 为模板,p531、p532 为引物,PCR 扩增出约 0.55kb 左右的片段(图略),扩增产物经 *Eco*RI 和 *Xba*I 酶切后克隆到 pFGST 的相应位点,重组质粒经酶切鉴定构建正确(图 2),命名为 pFGST-53。

2.4 重组病毒 rvBacGST53 的获得与鉴定

pFGST-53 转化 DH10Bac,提取 Bacmid DNA 转染 Sf9,获得重组病毒 rvBacGST53。采用 p531、p532 和 pG1、p532 两套引物对重组病毒进行检测,结果重组病毒能特异性扩增到 0.55kb 和 1.3kb 的条带(图 3),正好与单独的 ORF5 及 GST-ORF5 融合基因的大小相符,证实 GST-ORF5 融合基因已整合到重组杆状病毒中。

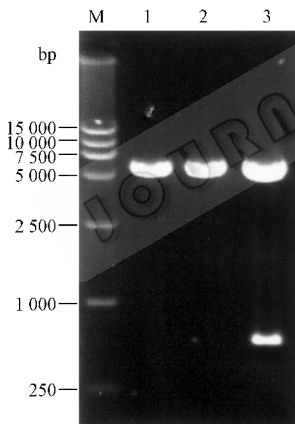


图 2 重组质粒 pFGST-53 的酶切鉴定

Fig.2 Identification of the recombinant plasmid pFGST-53

M. DNA marker(DL 15 000); 1. pFGST-53/*Eco*RI ;

2. pFGST-53/*Xba*I ; 3. pFGST-53/*Eco*RI + *Xba*I.

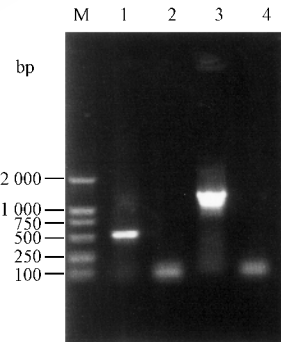


图 3 重组杆状病毒 rvBacGST53 的 PCR 鉴定

Fig.3 Identification of rvBacGST53 by PCR

M. DNA marker(DL 2 000); 1 2. Amplify ORF5 gene

from rvBacGST53 and rvBacGST, respectively ;

3 4. Amplify GST-ORF5 fusion gene from

rvBacGST53 and rvBacGST, respectively.

2.5 GST-ORF5 融合蛋白的表达与免疫印迹检测

rvBacGST53 以 5pfu 量感染 Sf9 细胞,收集感染后 72 h 的细胞,SDS-PAGE 检测可见重组病毒感染的细胞在大约 45kD 处出现一条特异性条带(图 4-A),rvBacGST 感染的细胞在此处未出现条带,而在 27kD 处有一条明显的表达带,均与预期的大小相当,说明 GST-ORF5 融合基因在 Sf9 中获得表达。

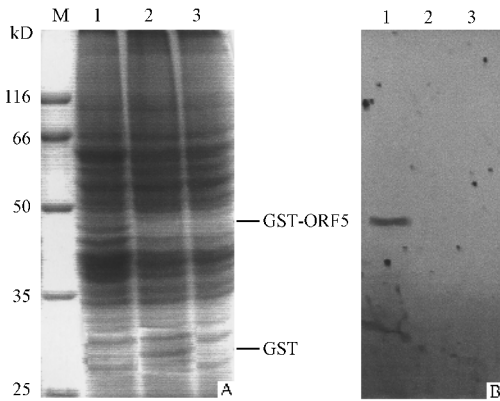


图4 GST-ORF5 融合基因在 Sf9 细胞中的表达 (A) 和 Western 免疫印迹 (B)

Fig.4 Expression of GST-ORF5 fusion gene in Sf9 cell (A) and Western blot of the fusion protein (B)
A :M. Protein marker ; 1. rvBacGST53 ; 2. rvBacGST ; 3. Negative control (Bacmid). B :1. rvBacGST53 ; 2. rvBacGST ; 3. Negative control.

将 SDS-PAGE 电泳分离的蛋白转印到硝酸纤维素膜上,以单抗 ISU25-C1 为一抗,HRP 标记的羊抗鼠 IgG 为二抗,化学发光底物作用后压 X-光片,结果也仅在 45kD 处出现特异性反应带(图 4-B)。

2.6 融合蛋白的免疫原性检测

将融合蛋白免疫 2 次后的小鼠血清作一抗,与 PRRSV 感染的 MARC-145 细胞进行间接免疫荧光试验,结果 4 只融合蛋白免疫鼠血清(1:40)均能使 PRRSV 感染的细胞呈很强的荧光着色(图 5-A),而 4 只 GST 蛋白(rvBacGST)免疫鼠血清(1:40)均为阴性,仅出现少许未洗净的荧光斑点(图 5-B),说明在昆虫细胞中表达的 GST-ORF5 融合蛋白具有良好的免疫原性。

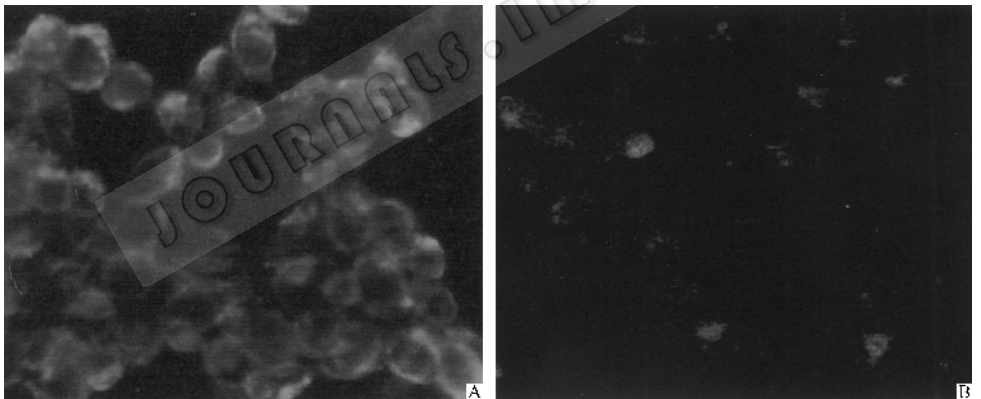


图5 GST-ORF5 融合蛋白抗血清与 PRRSV 感染的 MARC-145 细胞的间接免疫荧光检测

Fig.5 IFA of the PRRSV infected MARC-145 cells with antiserum against fusion protein GST-ORF5
A :rvBacGST53 ; B :Negative control (rvBacGST).

3 讨论

猪繁殖与呼吸综合征是一种极难防疫并且严重危害全球养猪业的新病毒性疫病。由于现有的疫苗(灭活苗与弱毒苗)存在或不安全或效果不好等缺陷^[11],世界各国学者都致力于新型基因工程疫苗研究,力求获得一种更安全、高效、廉价的新型疫苗,控制该病的发生与流行。作为 PRRSV 最主要的结构蛋白和免疫原性蛋白,ORF5 是设计 PRRS 新型疫苗的良好目标基因。Plana-Duran 等^[12]曾在昆虫细胞中表达了 ORF5 基因的全长 cDNA,用表达产物免疫猪,能使免疫猪获得良好的保护,开创了 PRRSV 第二代基因工程疫苗研究。

但同时也发现全长 ORF5 基因在昆虫细胞中的表达量不高。本研究室曾利用 Bac-to-Bac 系统表达 PRRSV YA 株 ORF5 基因全长 cDNA, 同样发现表达低的问题。我们也曾利用杆状病毒全期启动子表达伪狂犬病毒(Pseudorabies virus, PRV)gD 基因, 但表达量也不高^[13], 采用 GST 融合表达载体进行融合表达, 其表达量显著提高(陈新华. 博士学位论文, 中山大学, 2001)。因此, 在提高 ORF5 基因在昆虫细胞中表达量的研究中, 我们对与 GST 融合表达方式进行了尝试, 从本研究结果看, 表达量得到提高。与 GST 融合表达能显著提高表达量究竟是偶然还是一种值得借鉴的表达策略? 目前我们正对另外几个表达量不高的病毒基因进行同样的尝试, 探讨这一现象。

尽管目前已有商品化的与 GST 融合的杆状病毒表达载体, 但需要线性化的基因组, 同时还必须进行共转染和空斑纯化筛选, 不仅成本较高, 而且时间较长。Bac-to-Bac 系统是近年来发展起来的一种新型杆状病毒表达系统, 操作简便、快速, 不需要通过传统的同源重组和空斑纯化, 10~15 d 即可获得重组病毒。目前, 非融合或与多聚组氨酸(6xHis)融合的 Bac-to-Bac 表达系统已商品化, 但尚无与 GST 融合的 Bac-to-Bac 系统。因此, 我们对非融合的 Bac-to-Bac 系统进行了改造, 使之能快速获得与 GST 融合表达的重组杆状病毒。本研究正是利用这一改造的表达系统, 成功地在昆虫细胞中高效表达了 PRRSV gp5, 并通过免疫小白鼠与间接免疫荧光试验证实表达产物具有很好的免疫原性。此外, 与商品化的 GST 融合表达载体不同, 本研究改造的转座载体 pFGST 在 GST 编码区下游, 含有一修饰的 Thrombin 识别与切割位点, 能使 Thrombin 更有效地识别与切割^[7], 有利于下游纯化工作的顺利进行。

PRRSV gp5 除了在诱发机体免疫保护方面具有重要作用外, 最近, 又有研究表明 PRRSV 感染的康复猪血清中针对 gp5 的抗体滴度与中和病毒的能力呈显著相关性^[6], 因此, 有人提出采用体外表达的 gp5 作为抗原作为诊断试剂, 一方面解决目前针对 N 蛋白的分子诊断方法无法客观反映机体免疫状况的缺陷, 另一方面也适合 PRRS 新型疫苗(亚单位疫苗、核酸疫苗和病毒载体疫苗)抗体水平的检测, 但 ORF5 全基因在大肠杆菌和杆状病毒等表达系统的表达量很低, 使得这方面的进展缓慢。本研究通过对 ORF5 进行改造, 实现了在杆状病毒中的高效表达, 为下一步开发 PRRSV 新型分子诊断试剂奠定了基础。目前, 我们正利用 GST 纯化系统对表达的融合蛋白进行纯化, 建立针对 gp5 的 ELISA 和乳胶凝集试验(LAT)诊断方法。

参 考 文 献

- [1] Meulenber J J. PRRSV, the virus. *Vet Res*, 2000, 31(1): 11~21.
- [2] Blaha T. The " colorful " epidemiology of PRRS. *Vet Res*, 2000, 31(1): 77~83.
- [3] 蔡雪晖, 柴文君, 翁长江, 等. 猪繁殖与呼吸综合征及其在我国的现状与对策. *中国预防兽医学报*, 2000, 22(增): 202~205.
- [4] Pirzadeh B, Dea S. Monoclonal antibodies to the ORF5 product of porcine reproductive and respiratory syndrome virus define linear neutralizing determinants. *J Gen Virol*, 1997, 78(8): 1867~1873.
- [5] Albina E, Piriou L, Hutet E, et al. Immune responses in pigs infected with porcine reproductive and respiratory syndrome virus(PRRSV). *Vet Immuno Immunopath*, 1998, 61(1): 49~66.
- [6] Gonin P, Pirzadeh B, Gagnon C A, et al. Seroneutralization of porcine reproductive and respiratory syndrome virus correlates

- with antibody response to the GP5 major envelope glycoprotein. *J Vet Diagn Invest*, 1999, **11**(1):20~26.
- [7] Guan K L, Dixon J E. Eukaryotic proteins expressed in *Escherichia coli*: an improved thrombin cleavage and purification procedure of fusion proteins with glutathione S-transferase. *Anal Biochem*, 1991, **192**(2):262~267.
- [8] Yang L, Frey M L, Yoon J, *et al.* Categorization of North American porcine reproductive and respiratory syndrome viruses: epitopic profiles of the N, M, GP5 and GP3 proteins and susceptibility to neutralization. *Arch Virol*, 2000, **145**(8):1599~1619.
- [9] Sambrook J, Maniatis T, Fritsch E F. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.
- [10] 方六荣, 陈焕春, 肖少波, 等. 伪狂犬病毒 gE 基因在昆虫细胞中的高效表达. *生物工程学报*, 2001, **17**(4):416~418.
- [11] Meng X J. Heterogeneity of porcine reproductive and respiratory syndrome virus: implications for current vaccine efficacy and future vaccine development. *Vet Microbiol*, 2000, **74**(4):309~329.
- [12] Plana-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.
- [13] 陈新华, 杨林, 洪文洲, 等. 伪狂犬病病毒鄂 A 株包膜糖蛋白 gD 基因的克隆与表达. *微生物学报*, 2001, **41**(3):329~334.

Fusion Expression of the *ORF5* Gene of Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus in Insect Cells*

Fang Liurong Xiao Shaobo Niu Chuanshuang Zhang Hui Chen Huanchun**

(Laboratory of Animal Virology, College of Animal Science and Veterinary Medicine,
Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, China)

Abstract: A 0.75kb fragment containing the complete cDNA of glutathione-S-transferase (GST) and a modified thrombin cleavage sites were amplified and cloned into pFastBac1, the donor plasmid of Bac-to-Bac baculovirus expression systems, downstream from the polyhedrin promoter (pPolh), resulting in the GST fusion transposition plasmid pFGST. After transposition and transfection, SDS-PAGE analysis showed that the developed GST fusion expression system can highly express GST. The signal sequences of the major structural protein gene *ORF5* of porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) strain YA was removed by PCR and the truncated *ORF5* gene was inserted into pFGST and fused with GST to generate the transposition plasmid expressing GST-*ORF5* fusion protein. The recombinant baculovirus rvBacGST53 was obtained by transposition and transfection. GST-*ORF5* fusion protein was identified by SDS-PAGE and Western blot. The fusion protein is 45kD and is specific to the monoclonal antibody against the E protein of PRRSV. The fusion protein was directly injected into mice and the anti-sera can react with the PRRSV-infected MARC-145 cells by indirect immunofluorescent assay (IFA), indicating that the fusion protein have better immunogenicity.

Key words: Porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV), *ORF5*, GST, Fusion expression, Immunogenicity

* Supported by National 863 High Technology R&D Project of China (No. 2001AA213051) and the Youth Scientist Project of Wuhan City (No. 20025001041)

** Corresponding author