

猪繁殖与呼吸综合征病毒 N 蛋白的原核表达、纯化与结构分析

黄金海 杨汉春* 郭 鑫 陈艳红 查振林

(中国农业大学 农业部预防兽医学重点实验室 北京 100094)

摘 要 将猪繁殖与呼吸综合征病毒(PRRSV)BJ-4 毒株 N 基因克隆至原核表达载体 pET28a 中,得到重组表达载体 pET28-N 转化 *Escherichia coli* BL21(DE3) 细胞,获得可溶性表达,表达量占菌体蛋白的 28%。经 Proband Ni²⁺ 亲和层析获得重组蛋白 P28-N,圆二色谱(CD)测定结果表明,P28-N 重组蛋白螺旋占 26.1%,折叠占 23.7%,转角 19.8%,卷曲占 30.3%。并进一步绘制出 PRRSV N 蛋白的二级结构图。

关键词 猪繁殖与呼吸综合征病毒 N 蛋白,圆二色谱,二级结构

中图分类号 S852.65 文献标识码 A 文章编号 1001-6209(2004)06-0737-04

猪繁殖与呼吸综合征是引起猪流产、呼吸道病及增长缓慢的高度传染性的病毒病,造成严重的经济损失^[1,2]。PRRSV 可感染肺泡巨噬细胞,导致细胞凋亡和免疫抑制^[3,4]。PRRSV 基因组 ORF7 编码 N 蛋白,N 蛋白是感染细胞内含量最丰富、占病毒粒子组成 40%,免疫原性最强的蛋白;N 蛋白与病毒基因组 RNA 结合并折叠,在病毒粒子内可能形成 20~30nm 的球形二十面体结构^[5],N 蛋白上具有核仁定位信号,与病毒的转录调节密切相关^[6,7],N 端含有较多的赖氨酸、谷酰胺和天冬酰胺残基,可能与 RNA 结合有关,C 端组成壳形域,其 C 端 11 个氨基酸对衣壳的形成具有重要意义^[8]。最近,Doan 等^[9]得到 N 蛋白 C 端 57 个氨基酸的蛋白结晶,并解析了其三维结构,但目前仍缺乏完整 N 蛋白结构的认识。本研究克隆并可溶性表达了猪繁殖与呼吸综合征病毒 BJ-4 的 N 蛋白,经亲和纯化后,分析了其二级结构,为进一步认识 N 蛋白的功能提供依据。

1 材料和方法

1.1 质粒和菌株

表达载体 pET28a 购于 Novagen 公司, JM109、大肠杆菌 *Escherichia coli* BL21(DE3) 菌株购于 Amersham Pharmacia Biotech 公司, PRRSV BJ-4 ORF7 阳性重组质粒 pGEM-ORF7 由高云等^[10]构建。

1.2 酶和相关试剂

Taq DNA 聚合酶、Pfu DNA 聚合酶、dNTP 为 Sangon 公司产品;限制性内切酶 EcoR I、BamH I,

购自 TaKaRa 公司;T4 DNA 连接酶为 Biolabs 公司产品;DNA 快速纯化回收试剂盒购自博达泰克生物工程公司;PRRSV 阳性血清由 PRRSV BJ-4 毒株免疫 SPF 猪制备。

1.3 引物设计和合成

根据 PRRSV BJ-4 株 N 基因序列(GenBank 收录号 AF331831)^[11],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),P7U:5'-TA GGATCCATGCCAAATAACAACG-3', P7L:5'-TGC-CTCAAGAATTCCAGCCCATCA-3',以 P7U 和 P7L 为上下游引物扩增 ORF7,预期扩增产物长度为 401bp,克隆至 pET28a 载体,理论上表达一含 157 aa、分子量约 17.08kD、N 端带有 His-tag 的融合蛋白。

1.4 目的基因的克隆

以阳性重组质粒 pGEM-ORF7 为模板,利用 P7U、P7L 引物 PCR 扩增含有 BamH I / EcoR I 酶切位点的 ORF7 基因。PCR 反应条件:94℃ 3min,94℃ 45s,55℃ 40s,72℃ 45s,共 30 个循环;72℃ 5min。1% 琼脂糖凝胶电泳检查 PCR 产物。用限制性内切酶 EcoR I / BamH I 分别对目的基因 PCR 产物和表达载体质粒 pET28a 37℃ 水浴双酶切,按照 DNA 片段玻璃奶回收试剂盒说明,纯化回收目的 DNA 片段。将酶切载体与目的片段用 T4 DNA 连接酶连接。转化 JM109 感受态细胞,利用 Kan 抗性筛选重组转化体。

1.5 重组质粒的鉴定

挑取单个卡那霉素抗性转化子,接种含 Kan 的

基金项目:国家 973 项目(G1999011901)

* 通讯作者。Tel/Fax 86-10-62731296;E-mail: yanghanchun1@cau.edu.cn

作者简介:黄金海(1970-)男,陕西合阳人,副研究员,博士生,主要从事动物分子病毒学与免疫学研究,现在天津市畜牧兽医研究所工作。

收稿日期:2004-03-08,修回日期:2004-06-12

LB 培养基 过夜培养 ,用碱裂解法提取质粒。分别用 pET28a 载体 T7 上游引物、P7L 下游引物和 P7U、P7L 特异性引物进行 PCR 扩增 ,电泳鉴定扩增片段 ;用 *Eco*R I / *Bam*H I 双酶切重组质粒 ,电泳检查插入片段的大小 ;序列测定由华大中生生物科技有限公司完成。

1.6 基因工程重组表达菌的诱导表达

将鉴定后的重组表达质粒转化 BL21(DE3)感受态细胞 ,利用 Kan 抗性筛选重组转化子。按照文献 [12] 的方法进行靶蛋白的诱导表达及 SDS-PAGE 分析。

1.7 Western blot 分析

参照文献 [12] 的方法 ,应用 SPF 猪制备的 PRRS 阳性血清、HRP-兔抗猪 IgG 酶标结合物进行 Western blot 分析。

1.8 可溶性重组蛋白 P28-N 的亲合纯化

将 25℃ 诱导培养 4h 的重组菌 200mL 离心后 ,按约 1 :10(M/V)的比例加入预冷的含 1% Triton X-100 ,1mmol/L PMSF ,2mmol/L DTT ,500mmol/L NaCl 的 20mL 磷酸盐缓冲液(pH8.0) ,超声裂解、离心处理的上清经 0.22 μ m 的滤器过滤后 ,加入 1mL 镍亲和层析基质 ,装柱 4℃ 作用 30min。依次用 10~20 倍柱床体积、含 10mmol/L 咪唑和 20mmol/L 咪唑 ,500mmol/L NaCl 的磷酸盐缓冲液洗涤 3 次 ;并用考马斯亮兰 G-250 检测试剂(Bradford 法)间隔检测洗脱液。再用含 100~500 mmol/L 咪唑的磷酸盐缓冲液洗脱含 His-tag 的重组蛋白 P28-N ,分管收集 ,洗脱流速控制在 5~7mL/h。

SDS-PAGE 检验纯化蛋白的纯度 ,合并仅有目的蛋白的收集管 ,经分子截量 3 kD 的蛋白浓缩管(YM-3 型 ,Millipore 产品)浓缩后 ,4℃ 下磁力搅拌 PBS 液快速透析 4h ,收集蛋白 -70℃ 保存。

1.9 重组蛋白 P28-N 的 CD 分析

应用 Jasco J720 光谱仪在 25℃ 恒温下记录测定数据 ,比色杯光径为 0.1cm ,测定 190~250 nm 范围的光谱值 ,所有 CD 光谱用平均残基椭圆度 $[\theta]_{MRW}$ 表示 ,单位 $\text{deg} \cdot \text{cm}^2 \cdot \text{dmol}^{-1}$ 。通过计算在 222nm 的平均残基椭圆度计算 α 螺旋含量(X^H)。

$$X^H = \frac{[\theta]_{MRW}^{208} - 4000}{33000 - 4000} [\theta]_{MRW}^{208} = \frac{\theta_{\lambda}}{C_w l} \cdot \frac{M_{RW}}{100} ,$$

$$M_{RW} = \frac{M}{\text{氨基酸残基数}} , \theta_{\lambda} : \text{CD 观察值(度)} ;$$

C_w :蛋白浓度(mg/mL) ; l :样品杯光径(dm) ;

$[\theta]_{MRW}^{208}$:平均残基椭圆度 ; M_{RW} :平均残基分子量 ;

M :分子量(M/L)。

1.10 重组蛋白 P28-N 的二级结构预测

应用 EXPASY 服务器(<http://www.expasy.ch/tools/>)上的 SOPMA 方法^[13]预测 P28-N 重组蛋白的二级结构。

2 结果和分析

2.1 目的基因原核重组表达载体的鉴定

分别用 pET28a 载体 T7 上游引物、下游引物 P7L 和 P7U、P7L 特异性引物进行 PCR 扩增 ,电泳结果显示 PCR 产物及酶切片段的大小与预期结果一致。利用位于 pET28a 载体 T7 启动子上下游引物对重组质粒 pET28-N 进行测序 ,结果表明重组质粒 pET28-N 中的插入序列与 PRRSV BJ-4 株的 ORF7 基因完全一致。

2.2 重组菌的诱导表达和纯化

SDS-PAGE 检测表明重组蛋白的表达量随诱导时间的延长而增加 ,在诱导后 4h 表达量达到高峰(28%) ,超声裂解上清中含有可溶性的 P28-N 蛋白。

每管 1mL 依次收集高浓度咪唑洗脱的重组蛋白 ,经 SDS-PAGE 检测蛋白纯度。结果表明(图 1) ,经约 10~15 倍基质体积的洗脱液洗涤后 ,收集的洗脱液出现单一条带。

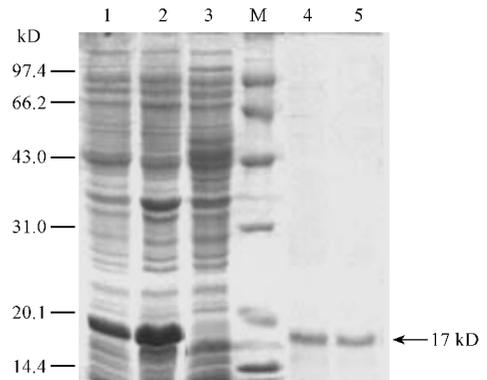


图 1 纯化 P28-N 蛋白的 SDS-PAGE 分析

Fig.1 SDS-PAGE analysis of the purified recombinant protein P28-N
1. Supernatant of induced P28-N recombinant bacteria ; 2. Induced bacteria ; 3. Uninduced bacteria ; M. Protein marker ; 4, 5. Purified recombinant protein .

2.3 重组蛋白的鉴定

Western blot 检测结果显示 P28-N 在约 17kD 处出现一清晰的特异性反应条带 ,而诱导的 pET28a 菌体无此蛋白条带。表明重组蛋白在大肠杆菌中得到了正确表达并保留了与 PRRS 病毒阳性血清反应的抗原性(图 2)。

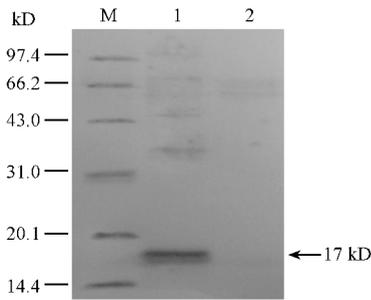


图2 重组蛋白的 Western blot 分析

Fig.2 Western blot analysis of the recombinant protein P28-N
M. Protein marker ; 1. P28-N protein ; 2. Not induced bacteria.

2.4 重组 N 蛋白的 CD 结构解析

对纯化的可溶性重组蛋白 P28-N 经圆二色谱测定,应用 Dr. J. T. Yang 的解析软件(yang.jsr)分析表明,重组蛋白 P28-N 中螺旋占 26.1% (41 个氨基酸),折叠占 23.7%,转角 19.8%,卷曲占 30.3%。应用 SPOMA 分析 P28-N 蛋白的结构,结果表明其中 α 螺旋约为 19.11% (即 30 个氨基酸), β 转角占 10.19% (16 个氨基酸),延伸链 14.65% (约 23 个氨基酸),无规则蜷曲占 56.05% (约 88 个氨基酸)。

2.5 PRRSV BJ-4 N 蛋白 2D 结构的分析

Doan^[7]最近解析了 PRRSV VR2332 毒株 N 蛋白 C 端 57 个氨基酸的三级结构,其中 C 端 57 个氨基酸中 α 螺旋所占氨基酸为 26 个。结合 SPOMA 二级结构的预测结果绘制出 PRRSV BJ-4 N 蛋白的二级结构图。N 蛋白含有 4 个 α 螺旋,2 条 β 链,多处转角。 α 螺旋所占氨基酸约为 40 个,与对 P28-N 的 CD 测定结果(α 螺旋为 41 个氨基酸)基本一致。

3 讨论

获得高纯度、可溶性、稳定的重组蛋白对 CD 分析非常重要^[14,15]。pET28a 表达系统是一种方便而且有效的原核表达载体,含有 T7lac 启动子,可用 IPTG 诱导产生高表达、含小分子量融合肽的融合蛋白,有利于蛋白的提纯。本研究应用该系统,通过构建 N 端带有 His-tag 的融合表达载体,获得了可溶性的重组表达蛋白。研究中发现,重组 P28-N 蛋白很不稳定,对蛋白水解酶高度敏感,极易发生降解。通过采取一些措施减少了蛋白降解^[16]。用 0.2 mmol/L IPTG 在 28℃ 诱导 4h,低温离心沉淀后加入蛋白酶抑制剂 PMSF,尽快超声裂解及其后续的纯化过程,可有效的防止降解;纯化蛋白也要尽快低温浓缩透析以除去洗脱液中高浓度的咪唑,-70℃ 冷冻保存。本研究通过单一的纯化步骤和迅速的低温冻存获得

了高度均一的重组蛋白,有效防止了蛋白降解,这为蛋白结构的分析奠定了基础。

N 蛋白是 PRRSV 功能最为复杂的蛋白。前期的研究表明,N 蛋白上至少有 7 个抗原决定簇,是 PRRS 病毒粒子中含量最多的结构蛋白,约占病毒粒子的 40%,是形成病毒核衣壳的基础,研究推测 N 蛋白可能形成 20~30nm 的二十面体的核衣壳核心。根据 N 蛋白的二级结构以及 Doan 解析的 N 蛋白 C 端部分二聚体的 3D 结构,可以了解 PRRSV 核衣壳形成的基本骨架。每个 N 蛋白 C 端 $\beta 1$ 、 $\beta 2$ 在较长 $\alpha 3$ 螺旋的同一侧形成反平行的 β 链,N 蛋白二聚体通过 4 个 β 链形成扁平的反相 β 层,两个较短的 $\alpha 2$ 、 $\alpha 4$ 螺旋则分别位于 β 层的两侧,这样,N 蛋白通过同源二聚体 β 折叠层形成衣壳内表面,N 蛋白 N 端则为病毒 RNA 结合域,位于衣壳内侧,从而形成蛋白衣壳的骨架。这样形成的 N 蛋白二聚体也使两个邻体上 51~67,80~90 位的氨基酸残基更加接近,从而形成 N 蛋白的构像型表位^[17,18]。C 端形成蛋白的壳形域,与衣壳的形成与稳定有关^[8]。含有 123 个氨基酸的 N 蛋白的 N 端(34~51aa 碱性区域)富含 Lys、Gln 和 Asn,可能与病毒 RNA 的结合有关^[7]。N 蛋白通过 31~37aa 间的非共价结合、通过 23 位 C 二硫键的共价结合形成规则有序的同源二聚体^[6,7]。大多数 N 蛋白单抗原识别 N 蛋白中心区域 52~69aa 之间的序列。分析表明该区域在 PRRSV 间相对保守,折叠后形成卷曲环状域,主要暴露于表面,从而形成主要的抗原表位。N 蛋白上包含一潜在的核定位信号 NLS-1、一个功能性的 NLS-2,一个核仁定位信号序列 NoLS,一个可能的核输出信号基元(NES)。这些功能基元只有与细胞内相应的转运蛋白结合,从而实现在核膜内外的穿梭转运^[6]。从 N 蛋白结构来看,富含碱性氨基酸的 NLS 位于亲水区域,并位于已暴露的无规则蜷曲处,可能利于其与其它转运分子的作用;N 蛋白 106~117aa 的 NES 基元 TVRLIR,位于 α 螺旋区,这样可以形成螺旋内疏水、亲水的外表面。这样在结构上利于该序列与 CRM1 蛋白作用,使 N 蛋白通过核膜从核内向胞浆转运^[6]。

以上分析表明,N 蛋白 3 个 α 螺旋区及 β 链对 N 蛋白衣壳的形成与结构起重要作用,其它卷曲结构则与其抗原性等功密切相关。NLS 等功能域位于富含碱性氨基酸的亲水区域,并位于已暴露的无规则蜷曲处,可能利于其与其它转运分子的作用。

参 考 文 献

- [1] Blaha T. The "colourful" epidemiology of PRRS. *Vet Res*, 2000, **31**: 77 - 83.
- [2] Meulenberg J J. PRRSV, the virus. *Vet Res* 2000, **31**(1): 11 - 21.
- [3] Murtaugh M P, Xiao Z, Zuckermann F. Immunological responses of swine to the PRRS virus infection. *Viral Immunol*, 2002, **15**: 533 - 547.
- [4] Li H, Yang H C. Infection of porcine reproductive and respiratory syndrome virus suppresses the antibody response to classical swine fever virus vaccination. *Veterinary Microbiology*, 2003, **95**: 295 - 301.
- [5] Doan D N, Terje D. Structure of the nucleocapsid protein of porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Structure*, 2003, **11**: 1445 - 1451.
- [6] Raymond R R, Yoo D. Nucleolar-cytoplasmic shuttling of PRRSV nucleocapsid protein: A simple case of molecular mimicry or the complex regulation by nuclear import, nucleolar localization and nuclear export signal sequences. *Virus Research* 2003, **95**: 23 - 33.
- [7] Wootton S, Yoo D. Homo-oligomerization of the porcine reproductive and respiratory syndrome virus nucleocapsid protein and the role of disulfide linkages. *J Virol*, 2003, **77**: 4546 - 4557.
- [8] 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. *Clin Diagn Lab Immunol*, 2001, **8**: 598 - 603.
- [9] Doan D N, Terje D. Cloning, expression, purification, crystallization and preliminary X-ray diffraction analysis of the structural domain of the nucleocapsid N protein from porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Acta Crystallographica*, 2003, **59**: 1504 - 1506.
- [10] 高云, 杨汉春, 刘平黄, 等. PRRS 病毒核衣壳蛋白在大肠杆菌中的高效表达. *中国兽医学报*, 2001, **5**: 438 - 440.
- [11] 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. *农业生物技术学报*, 2001, **9**(3): 212 - 218.
- [12] Sambrook J, Russell D W. *Molecular cloning: A Laboratory Manual*. 3rd ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001, Appendix 8: 40 - 55.
- [13] Geourjon C, Deléage G. SOPMA: Significant improvement in protein secondary structure prediction by consensus prediction from multiple alignments. *Cabios*, 1995, **11**: 681 - 684.
- [14] 王大成, 主编. *蛋白质工程*. 北京: 化学工业出版社, 2002, 10 - 42.
- [15] Maeng C Y, Mee S O, Park I H, et al. Purification and structural analysis of the hepatitis B virus PreS1 expression from *Escherichia coli*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2001, **282**: 787 - 792.
- [16] Greenfield N J. Methods to estimate the conformation of proteins and polypeptides from circular dichroism data. *Analytical Biochemistry*, 1996, **235**: 1 - 10.
- [17] Wootton S K, Nelson E A, Yoo D. Antigenic structure of the nucleocapsid protein of PRRSV. *Clini Diagn Lab Immunol*, 1998, **8**: 598 - 603.
- [18] Meulenberg J J, van Nieuwstadt A P, van Essen-Zandbergen A, et al. Localization and fine mapping of antigenic sites on the nucleocapsid protein N of PRRSV with monoclonal antibodies. *Virology*, 1998, **252**: 106 - 114.

Purification and Structural Analysis of The Nucleocapsid of PRRS Virus Expressed from *Escherichia coli*

HUANG Jin-Hai YANG Han-Chun* GUO Xin CHEN Yan-Hong ZHA Zhen-Lin

(Key Laboratory of Preventive Veterinary Medicine of Ministry of Agriculture, College of Veterinary Medicine, China Agricultural University, Beijing 100094, China)

Abstract: The DNA fragment encoding the nucleocapsid protein (N) of PRRSV BJ4 strain were cloned into the *Bam*H I / *Eco*R I sites of pET28a vector to construct the expression plasmid pET28-N by designing special primers. The soluble protein (P28-N) were obtained by introducing the expression plasmid into *E. coli* BL21(DE3) host cell, and the amount of recombinant protein reached to 28% of the total mass of bacterial protein. PET28-N were purified by nickel-affinity column of Proband resin. The circular dichroism (CD) analysis showed that the purified PET28-N shared a significant (26%) α -helical structure, β -sheet (23.7%), β -turn (19.8%), and random coil (30.3%), respectively. Finally, the secondary structure of N protein of PRRSV was deduced.

Key words: PRRSV, Nucleocapsid protein, Circular dichroism (CD), Secondary structure

Foundation item: Key Project of Chinese National Programs for Fundamental Research and Development (G1999011901)

* Corresponding author. Tel/Fax: 86-10-62731296; E-mail: yanghanchun1@cau.edu.cn

Received date: 03-08-2004