

微生物学报 *Acta Microbiologica Sinica*  
49(11): 1502 – 1509; 4 November 2009  
ISSN 0001 – 6209; CN 11 – 1995/Q  
<http://journals.im.ac.cn/actamicrocn>

## 猪繁殖与呼吸综合征病毒 Nsp2 蛋白原核表达纯化及其蛋白酶活性分析

瞿洪仁<sup>1,2</sup>, 李耀东<sup>1,2</sup>, 侯艳红<sup>3</sup>, 严景华<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>中国科学院微生物研究所, 北京 100101)

<sup>2</sup>中国科学院研究生院, 北京 100049)

<sup>3</sup>大北农集团, 北京 100080)

**摘要:**【目的】表达并纯化猪繁殖与呼吸综合征病毒非结构蛋白 2(Nsp2), 分析 Nsp2 的蛋白酶活性。【方法】本研究通过 PCR 分别扩增 *nsp2* 基因的 N 端和 C 端, 利用原核表达载体 pET21a(+) 表达 Nsp2 蛋白的 N 端和 C 端(即 Nsp2-N 和 Nsp2-C), 通过 Ni-NTA 琼脂糖亲和层析和凝胶过滤的方法纯化两个重组蛋白。预测 Nsp2-N 含有半胱氨酸蛋白酶结构域, 本研究利用 western blot 检测其顺式酶切蛋白酶活性; 并人工合成潜在的十肽底物, 利用体外多肽酶切实验检测其反式酶切蛋白酶活性。成功获得 Nsp2-N 和 Nsp2-C 蛋白的可溶性表达, 纯化后纯度高达 90%, 预测的 Nsp2-N 蛋白酶结构域在顺式切割和反式切割下均无法发挥蛋白酶活性。【结论】推测 Nsp2-N 中所预测的蛋白酶结构域其活性的发挥还需要其他宿主因子的辅助作用, 为进一步鉴定其生物活性和筛选抗病毒药物研究提供基础。

**关键词:** 猪繁殖与呼吸综合征病毒; 非结构蛋白 Nsp2; 亲和层析; 凝胶过滤

**中图分类号:** Q936 **文献标识码:** A **文章编号:** 0001-6209 (2009) 11-1502-08

猪繁殖与呼吸综合征(Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome, PRRS)是一种急性猪传染病, 最先于 1987 年在美国的北部报道出现<sup>[1-3]</sup>, 临床上主要表现为母猪早产和仔猪呼吸困难等症状<sup>[4]</sup>。PRRS 的病原体是猪繁殖与呼吸综合征病毒(Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus, PRRSV), PRRSV 属于套式病毒目<sup>[5]</sup>, 动脉炎病毒科, 动脉炎病毒属<sup>[6]</sup>。根据血清型的不同, 可将 PRRSV 分为欧洲株和北美株两个类型, 分别以 Lelystad Virus (LV) 和 VR-2332 为代表株<sup>[7-9]</sup>。

PRRSV 的基因组是长约 15 kb 的单链正义 RNA<sup>[11]</sup>, 一共含有 8 个开放阅读框(ORF)。占基因组

5'端 80% 的 ORF1 是最大的阅读框, 编码 12 个成熟的非结构蛋白。Nsp2 是 PRRSV 中最大的非结构蛋白, 也是各个毒株之间变异最为显著的蛋白<sup>[8,12]</sup>。PRRSV 的 Nsp2 蛋白与 EAV 的 Nsp2 蛋白有相似的序列结构<sup>[13]</sup>, 通过对 EAV 的 Nsp2 蛋白进行序列比对分析发现, PRRSV 的 Nsp2 含有 3 个主要的结构域: N-端的半胱氨酸蛋白酶结构域(CP2), 中间部位功能未知的多变区(HV)和 C-端的疏水跨膜区(TM)<sup>[12,14]</sup>。

预测 PRRSV Nsp2 蛋白 N-端的 CP2 结构域可能作用于 Nsp2/Nsp3, 此蛋白酶有两个潜在的酶切位点: 981G/G 和 1196G/G, 从而分别形成大小为 981 aa 和 1196 aa 的 Nsp2 蛋白<sup>[12]</sup>。中间部位的高变区虽然

基金项目: 基金项目: “十一五”支撑项目(2006BAD06A01)

\* 通信作者。Tel/Fax: +86-10-64807598; E-mail: yanjh@im.ac.cn

作者简介: 瞿洪仁(1984-), 女, 湖北省黄冈人, 硕士研究生。E-mail: quhr@im.ac.cn

收稿日期: 2009-05-20; 修回日期: 2009-06-26

功能未知,但显示出极大的基因灵活性,可以进行突变、插入和缺失,最多可以包装出 Nsp2 蛋白含有约 400 个氨基酸缺失的病毒<sup>[15]</sup>,还可以稳定插入和表达外源基因 EGFP<sup>[16]</sup>。研究表明 EAV Nsp2 蛋白的 C-端可以与 Nsp3 相互作用形成双层膜囊泡,从而作为 Nsp4 蛋白行使蛋白酶活性的辅因子<sup>[17-18]</sup>,但是 PRRSV 的 Nsp2 蛋白在病毒生命周期中的功能目前还是未知。

07BJ 株 PRRSV 是 2007 年在我国新出现的分离株,本研究利用原核表达系统分别表达 07BJ 株 PRRSV Nsp2 蛋白 N-端 323 aa 和 C-端 188 aa 两部分,分别命名为 Nsp2-N 和 Nsp2-C,并利用亲和层析和凝胶过滤的方法对蛋白质进行纯化。构建一个在酶切位点上游和下游均带标签的质粒表达带双标签的融合蛋白,用两个标签的抗体检测 Nsp2-N 蛋白 CP2 结构域顺式作用的酶活性;并人工合成预测的酶切位点处十肽底物,用纯化的 Nsp2-N 蛋白进行体外肽底物酶切实验,检测 CP2 反式作用的酶活性。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

#### 1.1.1 菌株、质粒及基因:大肠杆菌(*Escherichia coli*)

DH5 $\alpha$  菌株, BL21(DE3) 菌株, 高效融合原核表达载体 pET21a(+), 07BJ 株 PRRSV cDNA 基因均为本实验室保存。

**1.1.2 主要试剂和仪器:** Taq DNA 聚合酶, Pfu DNA 聚合酶, T4 DNA 连接酶和 *Nde* I、*Xho* I 限制性内切酶, 细菌碱性磷酸酶和 T4 多聚核苷酸激酶, DNA 分子量标准 DL2000 均购自 TaKaRa 公司; Rabbit-anti-His antibody, mouse-anti-Myc antibody, goat-anti-mouse IgG-HRP 和 goat-anti-rabbit IgG-HRP 均购自 SANTA CRUZ 公司; 凝胶成像系统为 Bio Rad 产品; Ni NTA Agarose, HiLoad 16/60 Superdex 75 分子筛层析柱及 AKTA 蛋白质纯化系统为 GE Healthcare 产品; 液相色谱仪为 Agilent Technologies 产品。

### 1.2 克隆 nsp2 基因

**1.2.1 引物:** 根据 GenBank 上 PRRSV 基因组序列 (Accession No. NC-001961) 和 Nsp2 蛋白氨基酸序列 (Accession No. NP-740596) 及大肠杆菌密码子偏好性设计引物, 以 07BJ 株 PRRSV cDNA 为模板, 分别 PCR 扩增 nsp2 基因 1-969 位和 2089-3498 位碱基, 即 Nsp2-N 和 Nsp2-C 的编码基因。现将本文所用引物列表如下:

表 1 本文所用的引物序列

Table 1 Primers used in this study

Primer	Sequence (5'→3')	Restriction Site
nsp2N-F	GGAATTC <b>CATATGGGTGCCG</b> GTAAGAGAGCA	<i>Nde</i> I
nsp2N-R	CCGCT <b>CGAG</b> CAAAGGCTCTTGAGTCAC	<i>Xho</i> I
nsp2C-F	GGAATTC <b>CATATGCAGG</b> GTCGTTGTA AAAAG	<i>Nde</i> I
nsp2C-R	CCGCT <b>CGAG</b> CCCTGAAGGCTTGA AAT	<i>Xho</i> I
Nsp2n-Myc-F	<b>TCGAGGA</b> ACAAAAC <b>T</b> CATCTCAGAAAGAGGATCTGAGGCAAATTTCCAAGCCTTCAG GGGGAGGCCACACCTCATTGCTGCC	<i>Xho</i> I
Nsp2n-Myc-R	<b>TCGAGGG</b> CAGCAATGAGGTGTGGGCTCCCCCTGAAGGCTTGAAATTTGCCTCAGAT CCTCTTCTGAGATGAGTTTTTTGTTC	<i>Xho</i> I

Forward primers are indicated with F in the designator, and reverse primers are indicated with R. Inserted restriction sites are shown in boldface. The primer pair Nsp2n-Myc-F/ Nsp2n-Myc-R will be described in materials and methods 1.4.1 in detail.

**1.2.2 目的基因扩增:** 用引物对 nsp2N-F/nsp2N-R、nsp2C-F/nsp2C-R 分别扩增 Nsp2-N 和 Nsp2-C 基因, 按文献[10]的方法采用 50  $\mu$ L 扩增体系进行 PCR 反应, 经酶切、连接、转化和重组质粒的筛选, 重组质粒经 PCR 鉴定和 *Nde* I、*Xho* I 双酶切鉴定及 DNA 测序, 所获得的序列正确的重组质粒分别命名为 pET21a-nsp2N 和 pET21a-nsp2C。

### 1.3 Nsp2-N 和 Nsp2-C 蛋白的表达与纯化

按文献[10]的方法进行质粒 pET21a-nsp2N 和 pET21a-nsp2C 分别转化大肠杆菌 BL21(DE3)、诱导表达及镍亲和柱纯化。以 20 mmol/L 的咪唑漂洗液

洗脱杂蛋白, 以 200 mmol/L 的咪唑洗脱液洗脱目的蛋白。用截流分子量为 10 kDa 的超滤管将洗脱液浓缩至 4 mL, 以 50 mmol/L NaCl, 20 mmol/L Tris-Cl (pH8.0) 的洗脱液上 HiLoad Superdex 75 16/60 和 Superdex200 10/300 分子筛层析柱纯化, 收集洗脱峰蛋白样品。经 12% SDS-PAGE 电泳鉴定后浓缩, 用 BCA 试剂盒测定蛋白质样品浓度并分装, 经液氮速冻后保存于 -80 $^{\circ}$ C。

### 1.4 Nsp2-N 蛋白酶活性分析

**1.4.1 构建双标签质粒并检测顺式酶切活性:** 对原重组质粒 pET21a-nsp2N 进行改造, 在 Nsp2-N 基因下

游插入 Myc 标签的编码序列和可能的酶切底物编码序列(Nsp2-C 末 8 位氨基酸的编码序列和 Nsp3 前 8 位氨基酸的编码序列),利用原质粒上的已有标签构建带有 Myc 和 His 双标签的重组质粒,双标签分别位于酶切位点的上游和下游。方法如下:

合成一对互补引物,其两端均为 *Xho* I 的粘性末端,5'到 3'依次为 Myc 标签的编码序列,Nsp2-C 末 8 位氨基酸的编码序列,Nsp3 前 8 位氨基酸的编码序列,序列见表 1。先用 T4 多聚核苷酸激酶将两引物 5'端磷酸化,反应体系:引物 1(100  $\mu$ mol/L)2  $\mu$ L,引物 2(100  $\mu$ mol/L)2  $\mu$ L,T4 多聚核苷酸激酶(PNK)10 U,10  $\times$  T4 连接酶缓冲液 5 $\mu$ L,加去离子水至总体积 50  $\mu$ L,反应条件为 65 $^{\circ}$ C,30 min。再使引物退火,方法为:将磷酸化后的引物置于 95 $^{\circ}$ C 水浴 10 min,然后缓慢冷却至室温(约 1 h)。

将重组质粒 pET21a-nsp2N 用 *Xho* I 单酶切处理使之线性化,并用碱性磷酸酶去磷酸化,再将上述退火产物连接至线性化重组质粒,转化大肠杆菌 DH5 $\alpha$  菌株,挑取单菌落用 nsp2N-F/ nsp2C-R 引物对 PCR 鉴定,阳性克隆提质粒命名为 pET21a-nsp2n-Myc,送样测序并与已知序列比对。

测序正确的质粒按材料与方法 1.3 所述转化并诱导表达,细菌裂解液用预染 Marker 进行 SDS-PAGE 电泳,转膜,封闭液封闭,并分别用抗 Myc 和抗 His 标签的两种抗体孵育 1 h,TBST 洗 3 次后与辣根过氧化物酶(HRP)标记的相应二抗孵育 1 h,辣根过氧化物酶化学发光显色法检测 Western-blot 免疫印迹分析的结果。

**1.4.2 体外肽段酶切分析检测反式酶切活性:**人工合成两条十肽(含有预测的 CP2 两个潜在的酶切位点,即 nsp2 蛋白 C-末端 5 位氨基酸和 nsp3 蛋白 N-端前 5 位氨基酸,多肽序列分别为 P1: GRLLGGARYI,P2: SKPSGGGPHL),用 100% DMSO 溶解至终浓度为 50 mmol/L,分子筛纯化分别收集 Nsp2-N 蛋白聚体峰和单体峰,浓缩至 10 mg/mL。酶切反应体系如下:肽底物终浓度为 250  $\mu$ mol/L (0.5  $\mu$ L),Nsp2-N 蛋白终浓度均为 5  $\mu$ mol/L,加酶切缓冲液(20 mmol/L Tris, pH7.4, 150 mmol/L NaCl, 1 mmol/L EDTA, 1 mmol/L DTT, 10% 甘油)至总体积 100  $\mu$ L,并设一不加蛋白样品的空白对照。37 $^{\circ}$ C 孵育 12 - 16 h,然后加等体积 2% 三氟乙酸终止反应,样品 12000 r/min 离心 10min 后用  $C_{18}$  吸附柱反向高效液相色谱分析。分析柱的水相为 0.1% 的三氟乙酸,有机相为乙腈,20 min 20% - 50% 的线性梯度,

以 215 nm 处的紫外吸收值分析肽段的是否被酶切。

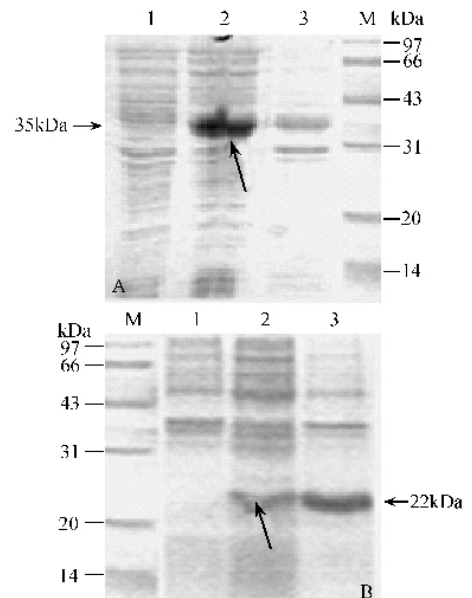
## 2 结果和分析

### 2.1 Nsp2-N 和 Nsp2-C 的克隆

PRRSV Nsp2 蛋白是一个大小为 1196aa 的跨膜蛋白,在原核系统中可溶性表达困难较大,因此我们分别表达了可能具有 CP2 活性的 N 端和存在重要作用的 C 端。以 07BJ 株 PRRSV cDNA 基因为模板进行 PCR 扩增,扩增产物在 1% 琼脂糖凝胶进行电泳,结果显示两个产物的条带分别约为 1 kb 和 550 bp,与目的大小相吻合。两个重组质粒分别经 *Nde* I、*Xho* I 双酶切鉴定,结果均能切下与 PCR 产物大小一致的条带。DNA 测序结果证实插入的基因序列完全正确。

### 2.2 Nsp2-N 和 Nsp2-C 蛋白的表达和纯化

将测序正确的阳性重组质粒 pET21a-nsp2N 和 pET21a-nsp2C 按材料与方法 1.3 所述转化并诱导表达,细菌超声裂解后分别取上清和沉淀进行 12% SDS-PAGE 电泳,结果如图 1 所示,Nsp2-N 和 Nsp2-C 在原核细胞中均为可溶性表达,分子量分别为 35 kDa 和 22 kDa,与预期大小相同。



**Fig. 1 Nsp2-N 和 Nsp2-C 蛋白诱导表达**

Fig. 1 Expression of Nsp2-N and Nsp2-C in BL21 strains. A: Expression of Nsp2-N in BL21 strains. B: Expression of Nsp2-C in BL21 strains. Lane 1 in A and B: the whole lysate of non-induced pET21a-nsp2N/BL-21 and pET21a-nsp2C/BL-21. Lane 2: the supernatant of induced pET21a-nsp2N/BL-21 and pET21a-nsp2C/BL-21. Lane 3: the precipitation of induced pET21a-nsp2N/BL-21 and pET21a-nsp2C/BL-21. M: protein marker.

确定表达条件后,大量表达纯化 Nsp2-N 和 Nsp2-C 蛋白。Ni-NTA 柱分离纯化带 His 标签的 Nsp2-N 和 Nsp2-C 蛋白,再分别过 HiLoad Superdex75 16/60 分子筛层析柱纯化目的蛋白,收集样品。Nsp2-N 和 Nsp2-C 纯化结果分别如图 2-A 和图 2-B 所示。Nsp2-N 蛋白在洗脱体积为 47.1 mL、51.3 mL 和 57.3 mL 时均有洗脱峰出现,根据标准蛋白质峰形图谱推测前面两个洗脱峰为多聚体峰,而 57.3 mL 处的对称峰的相对分子量为 35 kDa 左右,为单体峰。对应收集的蛋白样品(2-13 号)经 SDS-PAGE 电泳发现,聚体峰收集的样品(2-6 号)除了有 35 kDa 的条带外,还有 70 kDa 的条带,单体峰收集样品(7-13 号)只有 35 kDa 的条带,目的蛋白纯度达到 95% (图 2-A)。Nsp2-C 蛋白在洗脱体积为 77.1 mL 时有对称峰,对应收集的蛋白样品(5-14 号)经 SDS-PAGE 电泳分析其  $M_r$  约为 22 kDa,目的蛋白纯度达到 98%(图 2-B)。

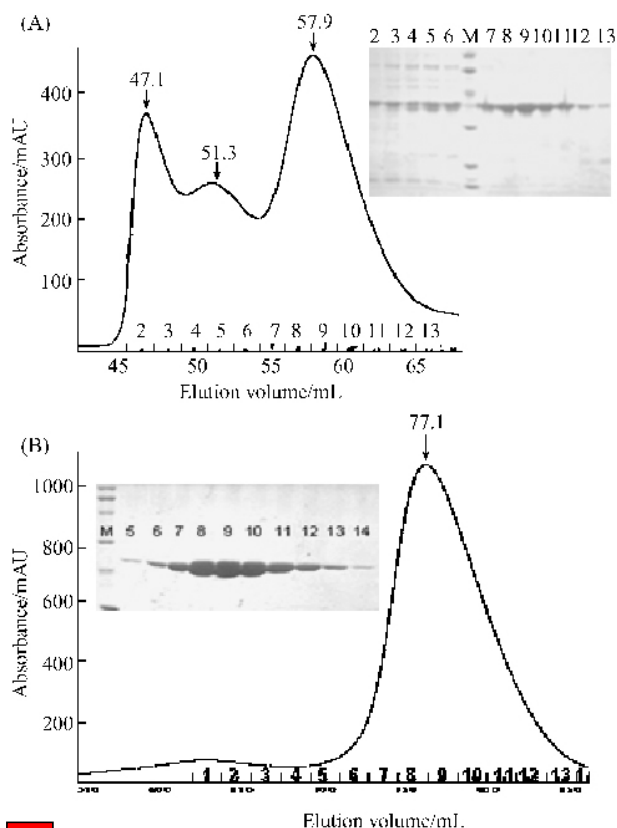


图 2 Nsp2-N(A 图)和 Nsp2-C(B 图)蛋白分子筛纯化及电泳结果

Fig.2 Superdex75 gel filtration purification and SDS-PAGE analysis of Nsp2-N (A) and Nsp2-C (B).

### 2.3 Nsp2-N 蛋白酶活性的研究

根据生物信息学预测和序列比对分析发现, Nsp2-N 含有半胱氨酸蛋白酶结构域(CP2),因此我

们用 Western-blot 免疫印迹分析和体外肽段酶切分析分别检测顺式作用和反式作用下其是否能发挥蛋白酶活性。

**2.3.1 western blot 检测顺式切割:** 由于重组质粒 pET21a-nsp2n-Myc 上的底物编码序列含有与引物 nsp2C-R 的互补序列,因此选择 nsp2N-F/nsp2C-R 引物对 PCR 扩增进行鉴定,1% 琼脂糖凝胶电泳结果显示能扩增出与目的片段大小相吻合的条带。

PCR 鉴定为阳性的克隆送样测序,结果与已知系列相符。按材料与方法 1.3 所述转化,诱导表达,12% 的 SDS-PAGE 鉴定蛋白表达结果如图 3-A 所示,该融合蛋白命名为 Nsp2-N-Myc,其示意图如图 3-B 所示。

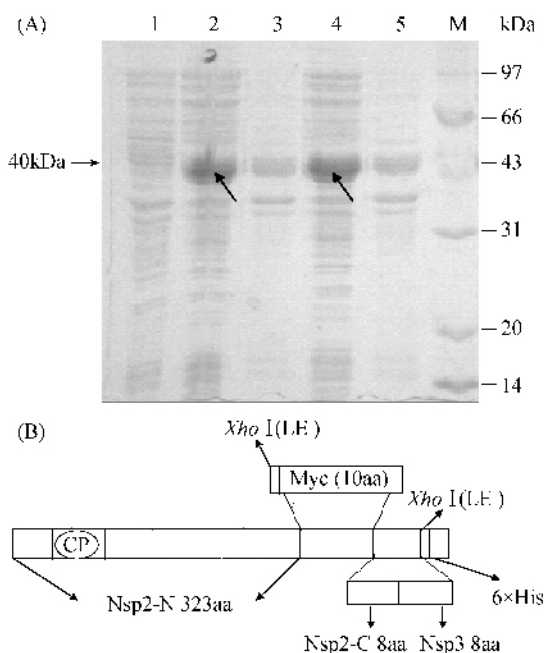


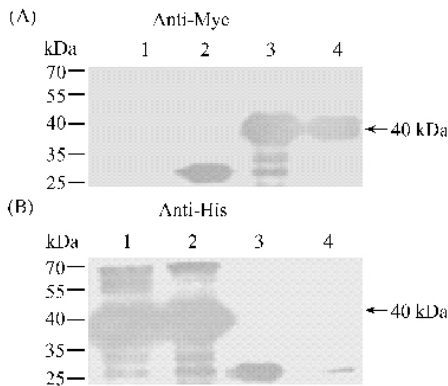
图 3 Nsp2-N-Myc 蛋白诱导表达及其示意图

Fig.3 Expression of Nsp2-N-Myc in BL21 strains and the sketch map of Nsp2-N-Myc. A: Expression of Nsp2-N-Myc in BL21 strains. Lane 1: the whole lysate of non-induced pEpET21a-nsp2n-Myc / BL-21. Lane 2 and 4: the supernatant of induced pET21a-nsp2n-Myc/ BL-21. Lane 3 and 5: the precipitation of induced pET21a-nsp2n-Myc/ BL-21. M: protein marker. The target protein is shown with the arrow. B: the sketch map of Nsp2-N-Myc

确定 Nsp2-N-Myc 诱导表达的条件后,即以诱导后的细菌裂解液进行 Western-blot 免疫印迹分析检测 CP2 的顺式切割蛋白酶活性。如图 3-B 的示意图所示, Nsp2-N-Myc 的 N-端含有 CP2 结构域, C-端含有底物位点,如果 CP2 能够顺式切割作用于底物序列,则融合蛋白 C-末端的 His 标签被切割掉,则 western blot 不能用抗 His 的抗体检测到信号;如果底



物没有被切割,则用抗 Myc 和抗 His 的抗体都能检测到信号。结果如图 4 所示,用抗 Myc 和抗 His 的抗体都能在 40 kDa 处检测到信号,与重组蛋白 Nsp2-N-Myc 的大小相吻合,说明 CP2 在大肠杆菌体内不能以顺式切割作用于 Nsp2/Nsp3 的连接处。



**4 Western blot 结果**

Fig.4 Results of western blot. A: Detected by anti-Myc antibody. 1: Negative control of non-induced BL21. 2: Positive control of known protein containing Myc-tag. 3 and 4: sample to be detected. B: Detected by anti-His antibody. 1 and 2: sample to be detected. 3: Negative control of non-induced BL21. 4: Positive control of known protein containing His-tag.

**2.3.2 体外肽段酶切分析检测反式切割:顺式切割**  
检测不到蛋白酶活性,我们就尝试检测反式切割。人工合成两条可能为酶切位点的十肽序列(P1 和 P2),按材料与方法 1.4.2 所述,设计图 5-A 中六个反应,P1C 和 P2C 为不加 Nsp2-N 蛋白的空白对照,P1R1 和 P2R1 分别为加 Nsp2-N 蛋白单体后两条十肽的反应,P1R2 和 P2R2 为分别加 Nsp2-N 蛋白聚体后两条十肽的反应。37℃ 孵育 12 ~ 16 h 后进行 HPLC 分析,P1 和 P2 的结果分别如图 5-B 和 5-C 所示。箭头所指为十肽的洗脱峰,两个底物的反应组与对照在出峰体积和洗脱面积上均没有差别,说明人工合成的两个十肽均没有被 nsp2-N 中的 CP2 结构域切开,初步推断 CP2 体外无法以反式切割的方式发挥半胱氨酸蛋白酶活性。

### 3 讨论

外源蛋白可以在原核、真核等系统中表达。大肠杆菌原核表达系统具有操作简单、成本低廉等优点,但是缺少翻译后修饰,如糖基化修饰,Nsp2-N 和 Nsp2-C 蛋白没有糖基化修饰,因此本研究选择大肠杆菌表达系统。本研究成功构建了 pET21a-nsp2N,pET21a-nsp2C 和 pET21a-nsp2n-Myc 三个重组质粒,

实现了外源蛋白在大肠杆菌 BL21(DE3)中的可溶性表达。利用重组蛋白 C-末端 His 标签,用 Ni-NTA agarose 亲和柱和分子筛凝胶柱纯化到了高纯度的 Nsp2-N 和 Nsp2-C 蛋白。

PRRSV 共编码 4 个蛋白酶,依次为 PCP1 $\alpha$ (木瓜蛋白酶样半胱氨酸蛋白酶 1 $\alpha$ ),PCP1 $\beta$ (木瓜蛋白酶样半胱氨酸蛋白酶 1 $\beta$ ),CP2(半胱氨酸蛋白酶)和 3CLSP(胰凝乳蛋白酶样丝氨酸蛋白酶),分别位于 nsp1 $\alpha$ ,nsp 1 $\beta$ ,nsp2 和 nsp4 中,其中 PCP1 $\alpha$ 、PCP1 $\beta$  和 CP2 是辅助蛋白酶,3CLSP 是主要蛋白酶,PCP1 $\alpha$ 、PCP1 $\beta$  属于木瓜蛋白酶家族,3CLSP 属于胰凝乳蛋白酶家族<sup>[12]</sup>。Snijder 等人的研究表明与 PRRSV 同属于动脉炎病毒属的马动脉炎病毒(EAV)Nsp2 蛋白具有半胱氨酸蛋白酶活性,可以通过顺式作用的方式作用于 Nsp2(Nsp3 的连接处从而释放 Nsp2 蛋白<sup>[12, 19]</sup>。发挥作用的是 Nsp2 蛋白的 CP2 结构域,其活性位点是 Cys-270 和 His-332,CP2 结构域与木瓜蛋白酶样蛋白酶有序列相似性。但是,典型的木瓜蛋白酶样蛋白酶在 Cys 后紧接着是一个 Trp,而 EAV 的 Nsp2 蛋白中 Cys 后紧接着的则是 Gly,Cys-Gly 又是胰凝乳蛋白酶样蛋白酶的典型特征,因此 PRRSV 的 CP2 结构域兼有木瓜蛋白酶和胰凝乳蛋白酶两者的特征<sup>[13]</sup>。EAV 的 Nsp2 主要是以顺式切割的方式在体内发挥活性,体内的反式切割也有证实但是切割效率相对较弱,但目前还没有体外实验直接证实其蛋白酶活性<sup>[12]</sup>。PRRSV 中的 CP2 结构域与 EAV 的 CP2 序列一致性达 23.9%,序列比对结果如图 6 所示:

由上图可以看出酶活性位点 Cys 和 His(箭头所指)在两者中高度保守,且都有 Cys-Gly 序列。但目前还没有实验证实 PRRSV 的 CP2 结构域能够作用于 Nsp2(Nsp3 的连接处),因此本实验利用大肠杆菌表达双标签融合蛋白和人工合成两个多肽底物,以期通过 Western-blot 免疫印迹分析和体外肽底物酶切实验验证 CP2 的半胱氨酸蛋白酶活性,但是目前的实验结果表明,无论是顺式切割还是反式切割,PPSV 的 CP2 均不能发挥半胱氨酸蛋白酶活性。推测 CP2 发挥蛋白酶活性还需要体内其他蛋白的辅助作用,细胞内的特定微环境也可能是 CP2 发挥活性所必需。此外,本实验是用一个截短的 Nsp2 蛋白来检测其酶活性,虽然 Nsp2 蛋白中间长达 400 个氨基酸缺失而不影响病毒正常包装<sup>[15]</sup>,但是这些氨基酸缺失可能会影响 Nsp2 蛋白发挥酶活性,因此下一步工作可以用全长 Nsp2 蛋白来检测其 CP2 的蛋

(A)

Reaction		c(Monomer)/ ( $\mu\text{mol/L}$ )	c(Oligomer)/ ( $\mu\text{mol/L}$ )	P1	P2	$T/^\circ\text{C}$
P1	P1C	0	0	250	0	37
	P1R1	5	0	250	0	37
	P1R2	0	5	250	0	37
P2	P2C	0	0	0	250	37
	P2R1	5	0	0	250	37
	P2R2	0	5	0	250	37

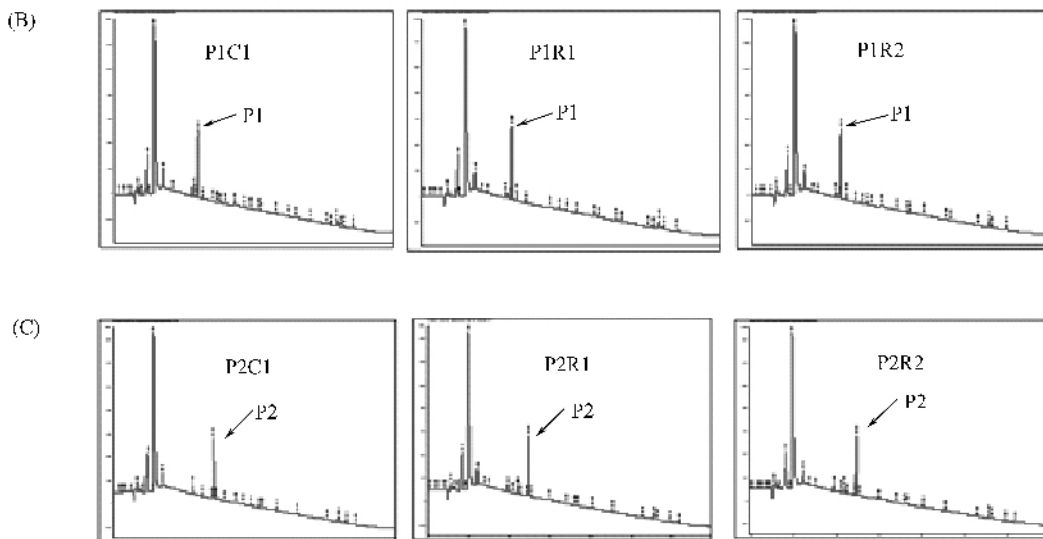


图 5 酶切活性体外检测

Fig.5 Cleavage activity assay *in vitro*. A: Cleavage reaction system. B: Detection of Protease activity of Nsp2-N for P1 by HPLC. C: Detection of Protease activity of Nsp2-N for P2 by HPLC.

白酶活性。若 CP2 的蛋白酶活性被证实就能用蛋白酶抑制剂来抑制病毒的活性，从而可以为抗病毒

药物的筛选提供靶标，并进一步为该蛋白酶的分类鉴定提供理论基础。

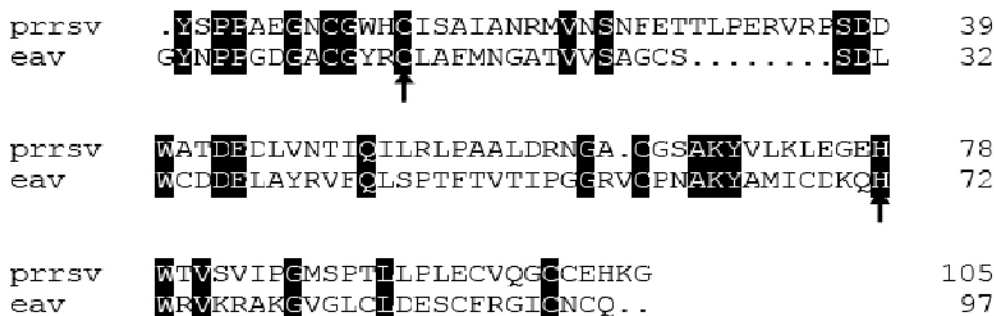


图 6 PRRSV 和 EAV 的 CP2 结构域序列比对,箭头所指为酶活性位点

Fig.6 Sequences alignment of CP2 in PRRSV and EAV. The active sites are shown by arrows.

## 参考文献

- [ 1 ] Albina E. Epidemiology of porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS): an overview. *Veterinary Microbiology*, 1997, 55 (1-4): 309-316.
- [ 2 ] Wensvoort G., Terpstra C, Pol JM, et al. Mystery swine disease in The Netherlands: the isolation of Lelystad virus. *The Veterinary quarterly*, 1991, 13(3): 121-130.
- [ 3 ] Elazhary Y, Weber J, Bikour H, et al. 'Mystery swine disease' in Canada. *The Veterinary Record*, 1991, 129 (22): 495-496.
- [ 4 ] Wensvoort G. Lelystad virus and the porcine epidemic abortion and respiratory syndrome. *Veterinary Research*, 1993, 24(2): 117-124.
- [ 5 ] Cavanagh D. Nidovirales: a new order comprising Coronaviridae and Arteriviridae. *Archives of Virology*, 1997, 142(3): 629-633.
- [ 6 ] Snijder EJ, Meulenberg JJ. The molecular biology of arteriviruses. *The Journal of General Virology*, 1998, 79 (5): 961-979.
- [ 7 ] Fletcher JE, Rosenberg H, Aggarwal M. Comparison of European and North American malignant hyperthermia diagnostic protocol outcomes for use in genetic studies. *Anesthesiology*, 1999, 90(3): 654-661.
- [ 8 ] Allende R, Lewis TL, Lu Z, et al. North American and European porcine reproductive and respiratory syndrome viruses differ in non-structural protein coding regions. *The Journal of General Virology*, 1999, 80 (2): 307-315.
- [ 9 ] Nelsen CJ, Murtaugh MP, Faaberg KS. Porcine reproductive and respiratory syndrome virus comparison: divergent evolution on two continents. *Journal of Virology*, 1999, 73(1): 270-280.
- [ 10 ] J. 萨姆布鲁克. 分子克隆实验指南. 黄培堂, 等译. 第三版. 北京: 科学出版社, 2002.
- [ 11 ] Meulenberg JJ, Hulst MM, de Meijer EJ, et al. Lelystad virus, the causative agent of porcine epidemic abortion and respiratory syndrome (PEARS), is related to LDV and EAV. *Virology*, 1993, 192(1): 62-72.
- [ 12 ] Ziebuhr J, Snijder EJ, Gorbalenya AE. Virus-encoded proteinases and proteolytic processing in the Nidovirales. *The Journal of General Virology*, 2000, 81(4): 853-879.
- [ 13 ] Snijder EJ, Wassenaar AL, Spaan WJ, et al. The arterivirus Nsp2 protease. An unusual cysteine protease with primary structure similarities to both papain-like and chymotrypsin-like proteases. *The Journal of Biological Chemistry*, 1995, 270(28): 16671-16676.
- [ 14 ] Han J, Wang Y, Faaberg KS. Complete genome analysis of RFLP 184 isolates of porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Virus Research*, 2006, 122(1-2): 175-182.
- [ 15 ] 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. *Journal of Virology*, 2007, 81 (18): 9878-9890.
- [ 16 ] Kim DY, Calvert JG, Chang KO, et al. Expression and stability of foreign tags inserted into nsp2 of porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV). *Virus Research*, 2007, 128(1-2): 106-114.
- [ 17 ] Wassenaar AL, Spaan WJ, Gorbalenya AE, et al. Alternative proteolytic processing of the arterivirus replicase ORF1a polyprotein: evidence that NSP2 acts as a cofactor for the NSP4 serine protease. *Journal of Virology*, 1997, 71 (12): 9313-9322.
- [ 18 ] Snijder EJ, 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. *The Journal of General Virology*, 2001, 82(5): 985-994.
- [ 19 ] Snijder EJ, Wassenaar AL, Spaan WJ. Proteolytic processing of the replicase ORF1a protein of equine arteritis virus. *Journal of Virology*, 1994, 68(9): 5755-5764.

# Expression and purification of Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus Nsp2 protein and analysis of cleavage activity

Hongren Qu<sup>1,2</sup>, Yaodong Li<sup>1,2</sup>, Yanhong Hou<sup>3</sup>, Jinghua Yan<sup>1\*</sup>

(<sup>1</sup> Institute of Microbiology, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101, China)

(<sup>2</sup> Graduate University, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China)

(<sup>3</sup> DA BEI NONG Group, Beijing 100080, China)

**Abstract:** [Objective] To express and purify Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus Nsp2 protein and analyze the protease activity of Nsp2. [Methods] N-terminus and C-terminus of *nsp2* gene were amplified by PCR and inserted into expression vector pET21a(+), respectively. The recombinant protein (Nsp2-N and Nsp2-C) were over expressed in *E. coli* BL21 and purified by Ni-NTA agarose affinity chromatogram and gel filtration. There is a cysteine protease domain (CP) in Nsp2-N through genetic alignment. In this study, the protease activity of Nsp2-N *in cis* was analyzed by western blot. Additionally, the predicted peptide substrate were synthesized, the protease activity *in trans* was analyzed by peptide cleavage assay *in vitro*. [Results] Two soluble recombinant protein were successfully expressed and purity reached up to 90% after purification. The putative protease domain of Nsp2-N couldn't cleave the predicted substrate through *cis* cleavage and *trans* cleavage. [Conclusion] The putative protease domain in Nsp2-N may need other host factors to act as cofactor, which supply basis for further identification of biological activity and screening of anti-virus drug.

**Keywords:** Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus; nonstructural protein 2 (Nsp2); affinity chromatogram; gel filtration

(本文责编:王晋芳)

Supported by the 11<sup>th</sup> Five Years Pillar Programs for Science and Technology Development of China (2006BAD06A01)

\* Corresponding author. Tel/Fax: +86-10-64807598; E-mail: yanjh@im.ac.cn

Received: 20 May 2009/ Revised: 26 June 2009

## 科学出版社新书推介(2009-09)

### 酶学(第二版)

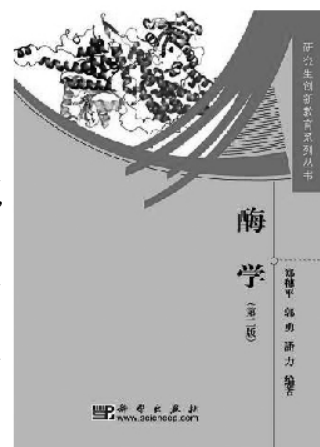
(研究生创新教育系列丛书)

郑穗平 郭勇 潘力 编著

978-7-03-025487-0 ¥49.00 2009年9月出版

**内容简介:**酶学(enzymology)是生物化学(biochemistry)的分支学科。本书从“酶是具有生物催化功能的生物大分子,根据其组成的不同可以分为蛋白类酶(P酶)和核酸类酶(R酶)两大类别”的概念出发,在酶的组成、结构、性质、功能、生物合成及其调节等方面阐明酶学的基本理论和基本知识。内容包括绪论、酶的结构与功能、酶的催化作用机制、酶反应动力学、酶的生物合成及调节机制和酶分子的定向进化,共六章。

本书可供高等院校酶学、酶工程、生物工程、生物制药、生物化工、发酵工程、生物技术、食品科学与工程等相关专业的本科生和研究生使用,也可供相关学科的教学工作者。



欢迎各界人士邮购科学出版社各类图书(免邮费)

邮购地址 北京东黄城根北街16号 科学出版社 科学出版中心 生命科学分社 邮编:100717

联系人 李韶文(010-64000849) 周文宇(010-64031535)

更多精彩图书请登陆网站 <http://www.lifescience.com.cn> 欢迎致电索要书目