

PRRSV Hn-1/06 株 GP5 蛋白基因的克隆及表达载体的构建

卢高峰, 夏平安^{*}, 邱璜, 李伟娟, 王中明, 刘明莉 (河南农业大学牧医工程学院, 河南郑州 450002)

摘要 [目的] 克隆 PRRSV Hn-1/06 株 GP5 蛋白基因并构建其原核表达载体。[方法] 根据 PRRSV 美洲株 ATCC-VR2332 的 ORF5 基因序列设计特异性引物, 用 RT-PCR 方法从 Hn-1/06 株中扩增得到 GP5 蛋白基因的片段, 与 PTG19-T 载体连接获得其阳性克隆 PTG19-T-ORF5。以该基因片段为模板分别设计 ORF5 完整序列和删除信号肽的 ORF5 序列两条引物, 进行 PCR 扩增, 将目的片段与原核表达载体 pET32a 连接, 并对其酶切鉴定。[结果] 扩增得到 GP5 蛋白基因全长序列 603 bp, 编码 200 个氨基酸残基; 具有 3 个潜在的 N-糖基化位点和 9 个半胱氨酸; 分子量为 22.4 kD, 等电点为 8.550; 双酶切 pET32a-ORF5 鉴定, 结果与预期一致, 证实重组质粒构建成功。[结论] 成功构建了 PRRSV Hn-1/06 株 GP5 蛋白基因的表达载体, 为深入研究 GP5 蛋白的本质与功能及其致病性奠定基础。

关键词 PRRSV; GP5 基因; RT-PCR; 表达载体

中图分类号 S188 文献标识码 A 文章编号 0517-6611(2008)26-11260-03

Cloning and Construction of Expression Vector of GP5 Gene of PRRSV Hn-1/06 Strain

LU Gao-feng et al (College of Animal Husbandry and Veterinary, Henan Agricultural University, Zhengzhou, Henan 450002)

Abstract [Objective] The aim was to clone the GP5 gene of PRRSV Hn-1/06 strain and construct its prokaryotic expression vector. [Method] The fragment of GP5 gene was amplified from the Hn-1/06 strain by RT-PCR using the specific primers designed from the sequence of the ORF5 gene from PRRSV American strain ATCC-VR2332. The positive clone of PTG19-T-ORF5 was obtained after connected with PTG19-T vector. The obtained fragment of the gene was used as template to design 2 primers with the complete sequence of ORF5 and the sequence of ORF5 deleting the signal peptide resp. The target fragment was connected with the pET32a prokaryotic expression vector after PCR amplification, then identified with enzyme restriction. [Result] The GP5 gene with full length sequence of 603 bp was obtained by amplification and it encoded 200 amino acid residues and had 3 potential N linked glycosylation sites and 9 cysteines. Its molecular weight was 22.4 kD and isoelectric point was 8.550. The result of two enzyme restriction identified pET32a-ORF5 was consistent with the anticipating result, which confirmed the recombinant plasmid was constructed successfully. [Conclusion] The expression vector of GP5 gene of PRRSV Hn-1/06 strain was constructed successfully, which laid the foundation for the further study of the essence, function and the pathogenicity of GP5 protein.

Key words PRRSV; GP5 gene; RT-PCR; Expression vector

猪繁殖与呼吸综合征自 1987 年在美国发生以来, 很快蔓延到世界各地, 给世界养猪业带来巨大经济损失^[1]。为此各国学者都在致力于研究安全、效果可靠、有效的基因工程疫苗。虽然 PRRSV 的分子生物学研究取得了很大进展, 但研制出安全、效果可靠、广谱的疫苗还为时尚早, 今后的研究将侧重于对免疫原性基因及致病基因的筛选、改造和利用。近年来国内外学者已经证明, GP5 基因是重要的宿主保护性基因, 而其编码的 GP5 蛋白是公认的中和作用相关抗原^[2-3], 具有诱导细胞凋亡的活性, 且可能参与病毒粒子结合病毒受体的过程^[4]。其抗体的出现与病毒血症的消失之间具有相关性, 能诱导产生强烈的体液免疫反应^[5], 因此, 笔者对 GP5 基因在 PRRSV 的致病性、诊断、预防与控制等方面进行研究, 旨在为下一步探讨 GP5 蛋白的本质和功能奠定基础。

1 材料与方 法

1.1 病毒、质粒载体与菌株 PRRSV Hn-1/06 株由河南农业大学兽医微生物实验室在 Marc-145 细胞上分离培养并保存。PTG19-T 载体、PCR 产物克隆系统等购自 Generay 公司; 原核表达载体 pET32a, 大肠杆菌 DH5 α 、BL21 均由河南农业大学兽医微生物实验室保存。

1.2 试剂和工具酶 RNA 提取 Trizol 试剂盒、RT 试剂盒、*rTaq* 聚合酶均购自 Promega 公司; DNA 回收试剂盒购自北京百泰克生物公司; 质粒快速提取试剂盒、DNA 胶回收纯化试剂盒、T4 DNA 连接酶、限制性内切酶 *Bam*H I 和 *Hind* III、DNA Marker 等均购自大连宝生物工程有限公司。

1.3 引物设计 参照猪繁殖与呼吸综合征病毒 (PRRSV) 美洲型标准株 (ATCC VR-2332) 基因序列, 设计包括 *ORF5* 全基因片段的一对特异引物: P1: 5'-AGCCTGTCTTTTGGCCAT-TCT-3', P2: 5'-CACTGGCGTGTAGTAATAG-3'。

该扩增片段预期大小为 718 bp, 引物由北京博尚生物公司合成。

1.4 PRRSV 总 RNA 的提取和 *ORF5* 基因扩增 按照分子克隆实验指南^[6] 提取病毒 RNA, 反转录后进行 PCR 反应, 反应参数为 94 °C 预变性 5 min, PCR 循环为 94 °C 45 s, 退火温度下 56 °C 1 min, 72 °C 1 min, 30 个循环后, 72 °C 延伸 10 min。全部反应结束后, 取 5 μ l PCR 产物进行 1.0% 琼脂糖凝胶电泳鉴定。

1.5 *ORF5* 基因的克隆与鉴定 按 DNA 胶回收试剂盒说明书纯化回收 PCR 产物, 并将胶回收产物连接于 PTG19-T 载体中, 连接产物按常规方法转化 DH5 α 感受态细胞, 涂布 LB/Amp/X-gal/IPTG 琼脂平板进行蓝白斑筛选, 挑选白斑接种于含有氨苄青霉素 (终浓度为 100 μ g/ml) 的 LB 培养基 37 °C 培养过夜。取培养物提取质粒, 进行 PCR 和酶切鉴定, 筛选出阳性重组质粒并命名为 PTG19-T-ORF5, 由北京博尚生物公司测序。

1.6 原核表达载体的构建 根据上述测序结果设计 2 对针对 *ORF5* 的特异性引物, 这 2 对引物分别扩增了包括 *ORF5* 完整开放阅读框序列和删除信号肽的 *ORF5* 序列, 长度分别为 603 和 507 bp。为能与表达载体相连, 上下游引物 5' 端分别设计了 *Bam*H I 和 *Hind* III 酶切位点。引物序列为: 上游引物: L1 5'-TATGGGATCCATGTTGGGAAATGCTT-3', 下游引物: L2 5'-TAGGAAGCTTCTAGGGACGACCCATT-3', 上游引物: W1 5'-ATATGGATCCAACAACAACCGCAGCTCTC-3', 下游

作者简介 卢高峰 (1979-), 男, 河南焦作人, 硕士研究生, 研究方向: 动物分子病毒学及分子免疫学。* 通讯作者。

收稿日期 2008-06-30

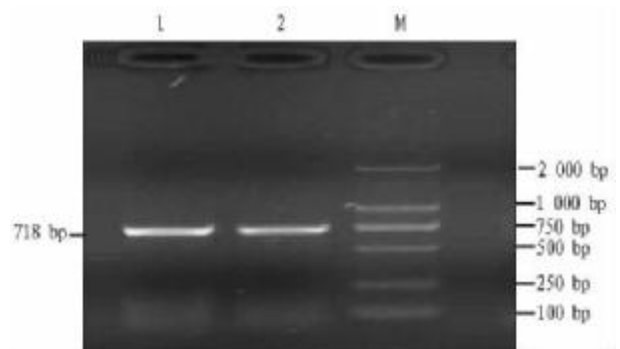
引物: W2 5'-TTACAAGCTTGGGACGACCCCATTTGTC-3'。

利用以上 2 对引物以 PTG19-T-ORF5 为模板进行 PCR 扩增,将上述 2 种 ORF5 扩增的基因经纯化后分别克隆到 PTG19-T 载体中,获得重组质粒分别命名为 PTG19-T-ORF5-L 和 PTG19-T-ORF5-W。重组质粒经 *Bam*H I 和 *Hind* III 双酶切,回收得到约 603 和 507 bp 的目的片段。将回收目的片段与酶切后 pET32a 于 22 °C 连接 1 h,4 °C 过夜,将连接产物转化感受态细胞培养,提取质粒,PCR 及酶切鉴定,筛选到的阳性克隆分别命名为 pET32a-ORF5-L 和 pET32a-ORF5-W 并对其插入的外源 DNA 进行测序。

2 结果与分析

2.1 目的基因的克隆 用 RT-PCR 法从 PRRSV Hn-1/06 细胞毒中扩增出与预期片段大小相符的特异性片段,其中扩增的 Hn-1/06 PRRSV ORF5 基因的大小约为 718 bp,扩增结果见图 1。

2.2 目的基因的序列测定及分析 将获得的 DH5 α 阳性克隆菌液送北京博尚生物公司测序,通过 DNASTar 软件分析表明,扩增得到的 PRRSV Hn-1/06 株的 ORF5 基因序列为 603 bp。包含 ORF5 的完整开放阅读框,G + C 含量为 51.08% ,



注:1 为 PRRSV 分离株 ORF5 基因 RT-PCR 扩增产物;2 为阳性对照 PRRSV RT-PCR 扩增产物。

Note:1. ORF5 gene RT-PCR product of PRRSV isolated sample; 2. RT-PCR product of positive PRRSV control.

图 1 PRRSV Hn-1/06 株 GP5 蛋白基因的 PCR 扩增

Fig.1 Amplification of GP5 gene of PRRSV Hn-1/06

用 BioXM2.6 软件分析表明,ORF5 基因序列共编码含 200 个成熟的氨基酸;具有 3 个潜在的 N-糖基化位点,有 9 个与二硫键形成有关的半胱氨酸;分子量为 22.4 kD,等电点为 8.550;疏水氨基酸 85%,亲水氨基酸 58%,碱性氨基酸 13%,酸性氨基酸 19% (图 2)。

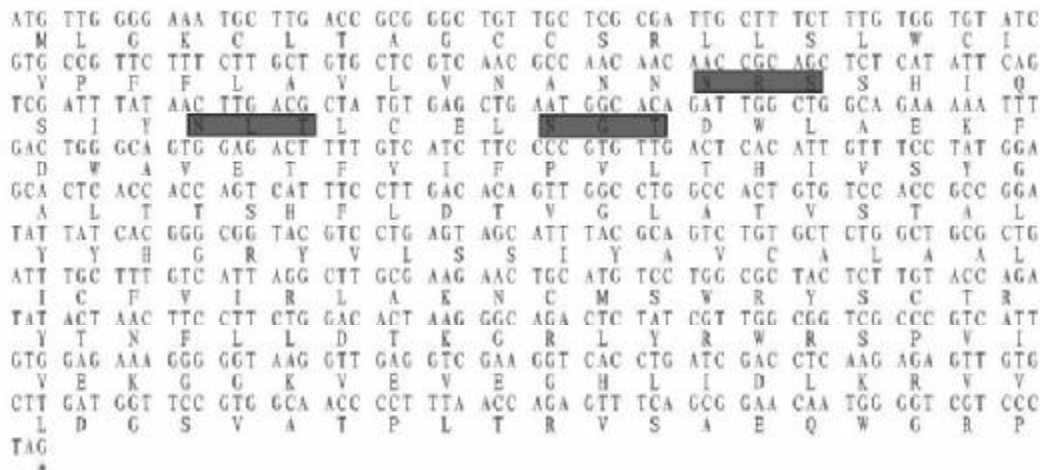


图 2 PRRSV Hn-1/06 株 ORF5 核苷酸及其编码的氨基酸序列

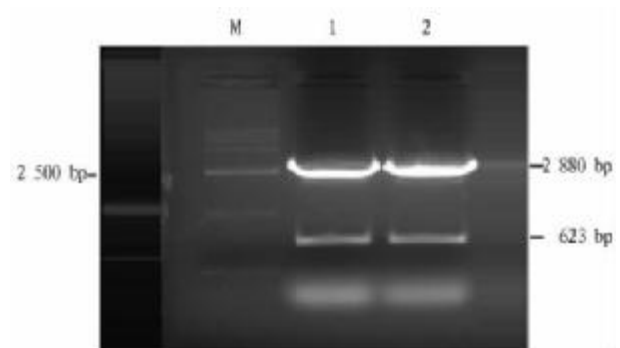
Fig.2 The ORF5 sequence and deduced amino acid of PRRSV Hn-1/06

2.3 重组克隆质粒的酶切鉴定 将经纯化回收、连接、转化、筛选白斑提取的质粒作 PCR 鉴定,获得阳性重组质粒 PTG19-T-ORF5,并用 *Bam*H I 和 *Hind* III 酶切,得到了与预期目标相符的大小 2 个片段,结果表明,目的 DNA 片段连接、转化正确 (图 3、4)。

2.4 重组表达质粒的鉴定 提取重组质粒,用 *Bam*H I 和 *Hind* III 双酶切重组质粒 pET32a-ORF5,酶切产物经琼脂糖凝胶电泳表明,酶切片段大小与预期结果完全一致,进而证实重组质粒构建成功 (图 5、6)。

3 结论与讨论

试验采用由 Novagen 公司开发出的 pET-32a 表达载体,属于高水平表达目标基因的 pET-32 系列载体的一种。这种载体可将目标基因与载体自身包含的硫氧还蛋白 (TrxA) 基因以融合蛋白的形式表达出来。硫氧还蛋白 (TrxA) 包含不同的细胞学功能,能显著增加目标蛋白的可溶性,促进目标蛋白的稳定表达。pET-32a 表达载体采用调控型启动子控制



注:M 为 DL15000 bp Marker ;1 为 2 PTG19-T-ORF5-L 双酶切产物。图 4 同。

Note:M. DL15000 bp Marker; 1, 2 Digestion product of PTG19-T-ORF5-L. The same as Fig. 4.

图 3 PTG19-T-ORF5-L 重组质粒酶切鉴定

Fig. 3 Enzyme digestion of recombinant plasmid PTG19-T-ORF5-L

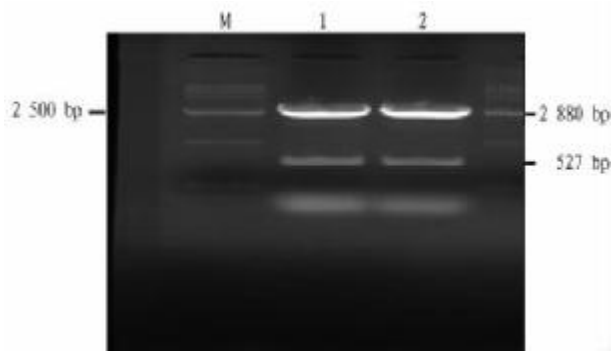
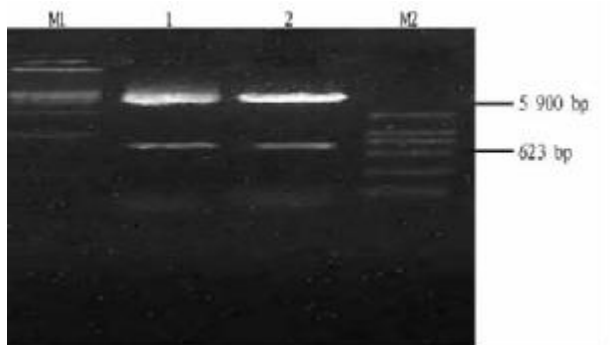


图4 PTG19-T-ORF5-W 重组质粒酶切鉴定

Fig.4 Enzyme digestion of recombinant plasmid PTG19-T-ORF5-W



注:M1为DL12000 bp Marker;M2为DL2000 bp Marker;1、2为pET32a-ORF5-L酶切产物。图6同。

Note:M1. DL12 000 bp Marker;M2. DL2 000 bp Marker;1,2. Digestion product of pET32a-ORF5-L. The same as Fig.6.

图5 pET32a-ORF5-L 酶切鉴定

Fig.5 Enzyme digestion of pET32a-ORF5-L

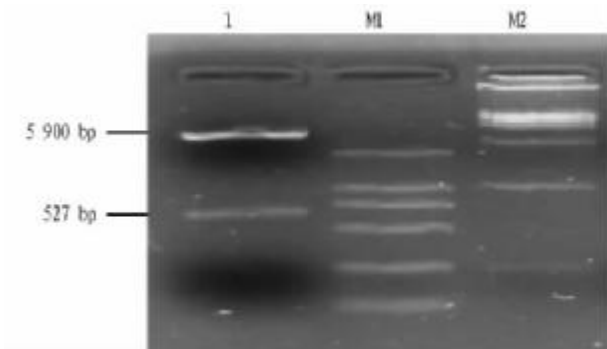


图6 pET32a-ORF5-W 酶切鉴定

Fig.6 Enzyme digestion of pET32a-ORF5-W

目标基因的表达。这种能控制基因在特定时期表达的模式既可避免宿主菌生长前期因目标基因的高表达对菌体生长的影响,又可减少细菌的蛋白水解酶对目标基因产物的降解。pET-32a 表达载体使用 T7 噬菌体启动子。在细胞中存在 T7RNA 聚合酶和 T7 噬菌体启动子的情形下,大肠杆菌宿主本身基因的转录竞争不过 T7 噬菌体转录体系,最终受 T7 噬菌体启动子控制基因的转录可达到很高的水平。该试验采用原核高效表达载体 pET32a 在 BL21 细胞中表达 PRRSV 的 GP5 蛋白,构建了包括 ORF5 完整开放阅读框序列的原核表达载体 pET32a-ORF5-L,但有报道用 PET 系统表达整个 GP5 基因,但未能表达,原因可能是 GP5 蛋白 N 端有一段 31 个氨基酸疏水性信号肽序列及 3 个跨膜功能区,这些区域可以使翻译的 GP5 蛋白停留在内质网(ER)内,从而抑制 GP5 蛋白的表达^[7]。该蛋白还具有一段很大的内部疏水区,可能起锚定作用。所以试验另构建了删除 GP5 基因自身 31 个氨基酸疏水性信号肽序列的原核表达载体 pET32a-ORF5-W。准备下步做表达时进行对比分析,以获得最佳表达量。为深入研究河南 PRRSV 分离株 GP5 蛋白的本质与功能及其致病性奠定基础。

参考文献

- [1] 郭宝清,陈章水,刘文兴,等.从疑似 PRRS 流产胎儿分离 PRRSV 的研究[J].中国畜牧兽医学报,1996,87(2):1-4.
- [2] WEILAND E, WIECZOREK KROHMER M, KOHL D, et al. Monoclonal antibodies to the GP5 of porcine reproductive and respiratory syndrome virus are more effective in virus neutralization than monoclonal antibodies to the GP4 [J]. Vet Microbiol, 1999, 66:171-186.
- [3] BAUSTISTA E M, MEULENBERG J J, CHOI C S, et al. Structural polypeptides of the American (VR-2332) strain of porcine reproductive and respiratory virus [J]. Arch Virol, 1996, 141:1357-1365.
- [4] DELPUTTE 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 heparinlike receptor on porcine alveolar macrophages [J]. J Virol, 2002, 76(9):4312-4320.
- [5] PETER G W, PLAGEMANN. GP5 ectodomain epitope of porcine reproductive and respiratory syndrome virus strain Lelystad virus [J]. Virus Research, 2004, 102:225-230.
- [6] 萨姆布鲁克 J, 拉塞尔 D W. 分子克隆实验指南[M]. 3 版. 北京:科学出版社, 2002.
- [7] 谷红, 杨汉春, 郭鑫, 等. PRRSV BJ24 株 ORF5 基因的原核表达与重组蛋白的纯化[J]. 畜牧兽医学报, 2004, 35(1):64-69.