

Marc-145 细胞 CD151 蛋白主要抗原表位区的表达及其与猪繁殖与呼吸综合征病毒感染关系的研究

肖一红¹, 王伟伟¹, 张璐¹, 高继明¹, 马晓春¹, 周恩民^{2*}

(1. 山东农业大学动物医学院, 泰安 271018; 2. 西北农林科技大学兽医免疫学研究所, 西北农林科技大学动物医学院, 杨凌 712100)

摘要: 为研究 CD151 与猪繁殖与呼吸综合征病毒 (PRRSV) 感染的关系, 根据 GenBank 中已发表的 CD151 蛋白的基因序列设计并合成一对特异性引物, 从 Marc-145 细胞中扩增出 294 bp 的 CD151 基因片段并克隆入 pGEX4T-3 载体, 转化入大肠杆菌用 IPTG 进行诱导表达, 经 SDS-PAGE 和 Western blot 对表达产物进行鉴定。表达蛋白纯化后用于免疫小鼠制备抗 CD151 蛋白血清, 用 ELISA 和 IFA 检测抗血清的效价及特异性。将抗 CD151 蛋白血清与 Marc-145 细胞孵育后再感染 PRRSV, 观察细胞 CPE 验证该血清对 PRRSV 的阻断效果。结果表明成功构建了 pGEX4T-3-CD151, 获得了相对分子质量为 37 ku 的重组 CD151 蛋白。制备的抗血清特异性结合 Marc-145 细胞并有效阻断 PRRSV 感染 Marc-145 细胞。这些研究结果为进一步阐明 CD151 与 PRRSV 感染的关系提供一定的理论基础。

关键词: CD151; Marc-145 细胞; PRRSV; 阻断

中图分类号: S852.659.2

文献标识码: A

文章编号: 0366-6964(2012)03-0410-06

Expression of Main Epitope Domains of CD151 from Marc-145 Cells and Relationship with Infection of Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus

XIAO Yi-hong¹, WANG Wei-wei¹, ZHANG Lu¹, GAO Ji-ming¹, MA Xiao-chun¹, ZHOU En-min^{2*}

(1. College of Veterinary Medicine, Shandong Agricultural University, Taian 271018, China;
2. Immunology Institute of Northwest A & F University, College of Veterinary Medicine, Northwest A & F University, Yangling 712100, China)

Abstract: To study the role of CD151 in porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) infection, primers specific to CD151 were designed according to the similar gene sequences submitted in GenBank. Total RNA was extracted from Marc-145 cell and a 294 bp of CD151 was amplified by RT-PCR. The target gene was cloned into pGEX4T-3 vector, then was transformed into *E. coli* and expressed with IPTG inducer. SDS-PAGE and Western blot were employed to identify the expressed protein. The protein was purified and used to immunize mice. The antiserum titres were determined by the ELISA and IFA, and were used to block PRRSV infection of Marc-145 cells. The results showed that CD151 gene was amplified and cloned into pGEX4T-3-CD151 vector. The recombinant CD151 protein with MW of 37 kDa was produced. The antiserum reacted specifically with the recombinant protein and blocked PRRSV infection of Marc-145 cells. These results provide useful information for further understanding the role of CD151 in PRRSV infection.

收稿日期: 2011-07-04

基金项目: 国家自然科学基金 (30871857; U0931003/L01; 30901063)

作者简介: 肖一红 (1976-), 女, 副教授, 主要从事 PRRSV 受体研究, E-mail: xiaoyihong01@163.com

* 通讯作者: 周恩民, E-mail: zhouem@nwsuaf.edu.cn

Key words: CD151; Marc-145 cell; PRRSV; blocking

猪繁殖与呼吸综合征 (Porcine reproductive and respiratory syndrome, PRRS) 于 1987 年首次发生于美国, 很快蔓延到世界各地, 成为当今危害养猪业主要的传染病之一, 给养猪业造成了巨大的经济损失。PRRS 是由 PRRS 病毒 (PRRS Virus, PRRSV) 感染引起, 主要表现为母猪流产、弱产、死产、木乃伊胎以及各年龄猪的呼吸道障碍性疾病^[1-3]。PRRSV 属于有囊膜单股正链 RNA 病毒, 基因全长约 15 kb, 有 9 个相互重叠的开放阅读框^[4-6]。体内 PRRSV 有严格的细胞嗜性, 以感染猪肺泡巨噬细胞 (Porcine alveolar macrophage, PAM) 为主, 其他组织 (如肝脏、脾脏、淋巴结等) 的巨噬细胞中也可检测到 PRRSV^[7]。体外, PRRSV 主要感染猴肾细胞系, 如 MA-104 细胞及其衍生细胞 Marc-145 细胞^[8-9]。

PRRSV 通过受体介导的内吞机制进入其易感细胞。目前已经报道的 PRRSV 受体有清道夫受体蛋白 CD163、唾液酸黏附素、硫酸乙酰肝素和波形蛋白及 CD151^[10-14]。其中 CD151 是新近报道的, CD151 属于四跨膜超家族蛋白 (TM4SF)。研究表明, TM4SF 在细胞的增殖与融合, 肿瘤的生长与迁移及血管生成中起重要作用^[15-16]。CD151 与 PRRSV 感染有关^[14], 但其在 PRRSV 感染过程中的作用还不清楚。为了研究 CD151 在 PRRSV 感染细胞中的作用, 作者通过 RT-PCR 方法特异性扩增出 CD151 蛋白的主要抗原表位区, 并进行了原核表达, 制备出抗 CD151 蛋白主要抗原表位的阳性血清, 验证其在阻断 PRRSV 感染 Marc-145 过程中发挥的作用, 为进一步阐明 CD151 与 PRRSV 感染的关系提供一定的理论基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 质粒、菌株和病毒 表达质粒 pGEX4T-3 及其宿主菌 *E. coli* DH5 α 和 *E. coli* BL21 DE3 由本实验室保存; 质粒 pMD18-T vector 购自 TaKaRa 公司。PRRSV 分离株 TA-12 为本实验室分离鉴定, 其 NSP2 缺失 30 个氨基酸, GenBank 登录号为 HQ416720。

1.1.2 试剂 PCR 扩增试剂盒, T4 连接酶, 限制性内切酶 *EcoR* I 和 *Xho* I 购自 TaKaRa 公司。

DNA 胶回收试剂盒, DNA Marker, 蛋白质 Marker 购自北京全式金公司。弗氏佐剂购自 Sigma 公司。辣根过氧化物酶 HRP 及 FITC 标记的羊抗小鼠 IgG 购自 Jackson 公司。GST 单克隆抗体及增强型 HRP-DAB 显色液购自北京天根生物技术公司。

1.2 方法

1.2.1 目的基因的 PCR 扩增及克隆 根据 GenBank 中人类 CD151 序列 (登录号: NM_004357.4) 设计并合成引物进行 RT-PCR 扩增。上游引物为 5'-GAGGAATCTACCAGCAGCT-GAA-3', 带有 *EcoR* I 酶切位点, 下游引物为 5'-CGACTCGAGCAACTTGGTGATGAA-3', 带有 *Xho* I 酶切位点, 扩增长度为 294 bp 的基因, 该片段位于人类 CD151 基因 345 至 633 bp 之间。PCR 体系包括 10 \times Taq Buffer 5 μ L, 2.5 mmol \cdot L⁻¹ dNTP 2 μ L, 20 μ mol \cdot L⁻¹ 上游引物和下游引物各 1 μ L, Taq 酶 0.5 μ L, ddH₂O 40.5 μ L。PCR 程序: 94 $^{\circ}$ C 预变性 5 min; 94 $^{\circ}$ C 1 min, 58 $^{\circ}$ C 45 s, 72 $^{\circ}$ C 45 s, 30 个循环; 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min。1% 琼脂糖凝胶电泳鉴定 PCR 产物, 回收目的片段, 与 pMD18-T vector 连接, 转化 *E. coli* DH5 α 感受态细胞。通过 PCR、酶切及测序对目的片段进行鉴定, 序列测定由南京金斯瑞公司完成。

1.2.2 表达载体的构建和鉴定 将鉴定正确的 PCR 产物和 pGEX4T-3 载体分别用 *EcoR* I 和 *Xho* I 酶切, 回收酶切产物, 经 T₄ 连接酶连接后转化 *E. coli* DH5 α 感受态细胞, 挑取阳性克隆, 提取质粒。通过 PCR、酶切及序列测定对重组质粒进行鉴定。

1.2.3 蛋白表达及鉴定 将构建的重组质粒 pGEX4T-3-CD151 转化 *E. coli* BL21 DE3 感受态细胞, 37 $^{\circ}$ C 培养至 OD_{600 nm} 为 0.6, 加入 0.5 mmol \cdot L⁻¹ IPTG 诱导表达 6 h, 收集菌体离心后取沉淀进行 SDS-PAGE 分析。采用半干转印法将目的蛋白转印至 PVDF 膜上, 用 2.5% 脱脂奶粉 37 $^{\circ}$ C 封闭 1 h, 加入 1:2 000 稀释的 GST-Tag 单克隆抗体, 37 $^{\circ}$ C 孵育 1 h, 加入 1:2 000 稀释的 HRP 标记的羊抗鼠 IgG, 37 $^{\circ}$ C 孵育 1 h, DAB 显色。

将阳性表达的重组体扩大培养, 经 IPTG 大量诱导表达, 离心收集菌体, PBS 重悬后冰浴超声破碎菌体, 用 GST 亲和层析柱按说明书纯化目的蛋白。

1.2.4 抗 CD151 蛋白血清的制备 纯化的 CD151 蛋白与等体积的弗氏完全佐剂乳化,免疫 6 周龄 BALB/c 小鼠($50 \mu\text{g} \cdot \text{只}^{-1}$),间隔 15 d,分别用弗氏不完全佐剂乳化相同剂量抗原进行二免和三免,ELISA 方法检测免疫小鼠血清的抗体效价。

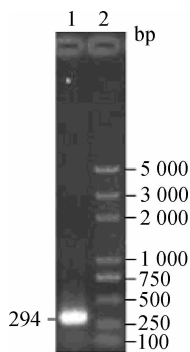
1.2.5 抗 CD151 蛋白血清的检测 长成单层 Marc-145 细胞,用 75% 的乙醇 4°C 固定 30 min,分别加入 $100 \mu\text{L}$ 的 1:10、1:20、1:40 和 1:80 稀释的抗 CD151 蛋白血清, 37°C 孵育 1 h,PBS 洗 3 遍,加入 1:200 稀释的 FITC 标记的羊抗鼠二抗, 37°C 孵育 1 h,PBS 洗 3 遍,以未免疫小鼠血清和 PBS 作为阴性对照,荧光显微镜观察。

1.2.6 抗 CD151 蛋白抗体阻断 PRRSV 感染 Marc-145 长成单层 Marc-145 细胞,分别加入 $100 \mu\text{L}$ 的 1:5、1:10、1:20 和 1:40 稀释的抗 CD151 蛋白的鼠血清, 37°C 孵育 1 h,弃掉血清,按 $100 \text{TCTD}_{50} \cdot \text{孔}^{-1}$ 接种 PRRSV 病毒, 37°C 孵育 1 h,弃去上清,每孔加入 $200 \mu\text{L}$ 含 3% FBS 的 DMEM 培养液,继续培养 5~7 d,每天观察 CPE。

2 结果

2.1 CD151 的基因克隆及载体构建

提取 Marc-145 细胞 RNA,通过 RT-PCR 方法扩增得到 294 bp 的片段与预期大小相符(图 1),测序结果表明该序列与人类 CD151 相同位置核苷酸相似性为 94.6%。经 PCR、酶切和测序表明 CD151 已成功的克隆入 pGEX4T-3 载体(图 2)。



1. RT-PCR 产物; 2. DNA 相对分子质量标准
1. Product of RT-PCR; 2. DNA marker

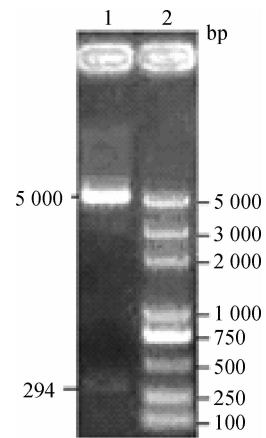
图 1 CD151 基因的 RT-PCR 产物

Fig. 1 Product of RT-PCR

2.2 CD151 蛋白的表达及鉴定

将重组质粒转化至 *E. coli* BL21 进行诱导表

达,SDS-PAGE 和 Western blot 结果表明该蛋白成功高效表达,为 37 ku 的可溶性蛋白(图 3)。

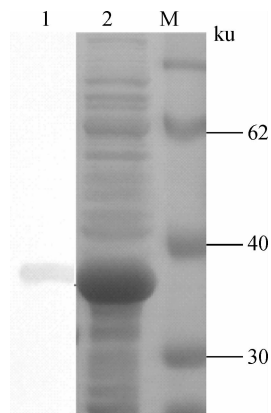


1. pGEX4T-3-CD151 经 *EcoR* I 和 *Xho* I 酶切产物; 2. DNA 相对分子质量标准

1. pGEX4T-3-CD151 digested by *EcoR* I 和 *Xho* I ; 2. DNA marker

图 2 重组表达质粒的双酶切鉴定

Fig. 2 Recombinant pGEX4T-3-CD151 plasmid digested by *EcoR* I 和 *Xho* I



1. 纯化的 CD151 Western blot 结果; 2. 诱导 6 h 全菌 SDA-PAGE ; M. 蛋白质相对分子质量标准

1. Western blot of purified CD151; 2. SDA-PAGE of whole protein at 6 h induction; M. Protein molecular weights marker

图 3 CD151 的表达及鉴定

Fig. 3 Expression and identification of recombinant CD151

2.3 鼠抗重组 CD151 蛋白血清抗体效价检测

取三免后 15 d 的鼠血清,用 ELISA 方法测定抗体效价,结果显示阳性血清 1: 10^5 稀释时 $A_{450 \text{ nm}}$ 为 0.51(图 4),其 P/N 值 >2.1 。

2.4 鼠抗重组 CD151 蛋白血清特异性检测

取三免后 15 d 小鼠的血清,用 IFA 方法检测抗 CD151 抗体与 Marc-145 细胞结合的特异性。结果

表明血清在 1 : 10、1 : 20 和 1 : 40 稀释时均能与 Marc-145 细胞结合(图 5A), 未免疫小鼠的血清不与 Marc-145 细胞结合(图 5B)。

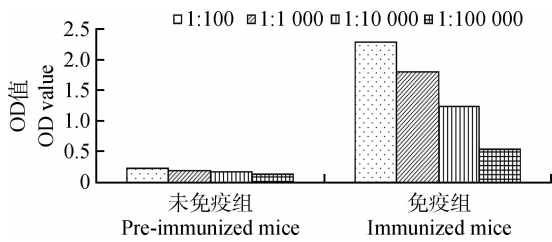
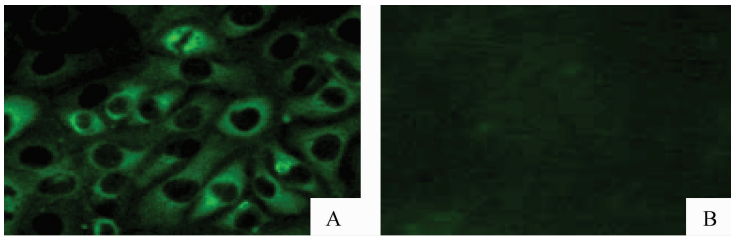


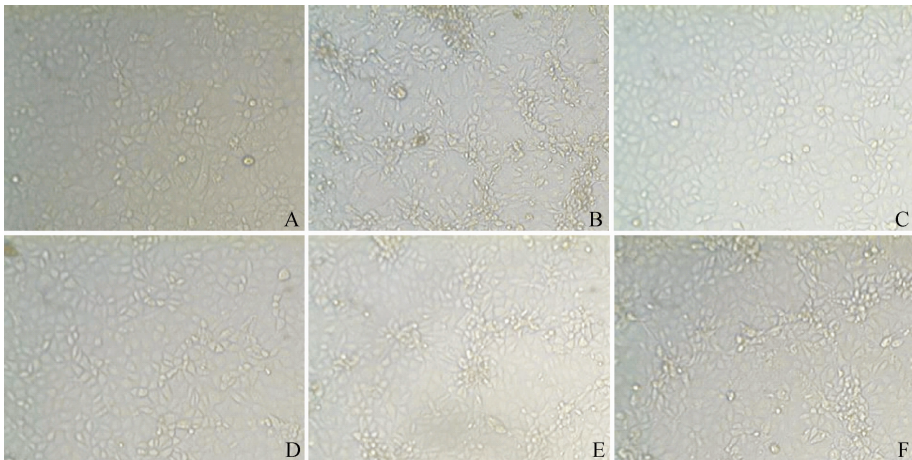
图 4 抗 CD-151 蛋白血清抗体水平 I-ELISA 检测结果
Fig. 4 Results of anti-CD151 antibody by I-ELISA



A. 免疫小鼠血清 1 : 20 , 40×; B. 未免疫小鼠血清 1 : 20 , 40×
A. Immune serum at dilution of 1:20, 40×; B. Pre immune serum at dilution of 1:20, 40×

图 5 鼠血清结合 Marc-145 细胞的 IFA 检测结果

Fig. 5 IFA results of mouse serum binding with Marc-145



A. 未接毒对照; B. 免疫前小鼠血清 1 : 5 稀释; C~F. 抗 CD151 血清稀释 1 : 5、1 : 10、1 : 20、1 : 40
A. Normal cell; B. Sera before immunization at 1:5 dilution ; C-F. Anti-CD151 antisera dilution at 1:5, 1:10, 1:20, 1:40 respectively

图 6 抗 CD151 血清阻断 PRRSV 感染 Marc-145 细胞的 CPE 结果

Fig. 6 CPE results of anti-CD151 serum blocking PRRSV infection of Marc-145 cells

3 讨论

病毒与受体相互作用是一个多步骤的过程, 病毒可以连续地或以细胞类型特异性方式使用多个受

2.5 抗 CD151 蛋白多克隆抗体阻断 PRRSV 感染细胞

结果显示(图 6), 高浓度抗 CD151 蛋白的抗血清(1 : 5 和 1 : 10 稀释)与 Marc-145 细胞孵育 1 h 后感染 PRRSV, 72 h 后未出现 CPE(图 6C、6D), 而低浓度的抗血清(1 : 20 和 1 : 40 稀释)出现 CPE(图 6E、6F)。免疫前小鼠血清(1 : 5 稀释)与细胞孵育后接种 PRRSV 出现 CPE(图 6B)。接毒 120 h 后, 高浓度抗 CD151 蛋白血清孵育的细胞未出现 CPE, 而低浓度血清及免疫前血清孵育的细胞出现 CPE, 并伴随细胞脱落。

体, 受体在细胞信息传递过程中起着重要的作用。病毒与细胞受体结合是病毒建立感染的首要步骤, 同样病毒与受体的相互作用决定宿主范围, 从而构成病毒感染细胞的特异性。

PRRSV 感染细胞是通过受体介导的内吞作用进入细胞,这个过程需要多种受体蛋白的协同作用,目前已报道的与该过程有关的蛋白主要是 CD163、唾液酸黏附素、硫酸乙酰肝素、波形蛋白及 CD151。易感细胞并不是表达所有的这些受体蛋白,PRRSV 感染不同易感细胞的机制不同。PRRSV 感染 PAM 的一般机制:PRRSV 首先与 PAM 上硫酸乙酰肝素结合,随后与唾液酸黏附素形成更牢固的结合^[17],吸附后的病毒通过网格蛋白介导由病毒-受体复合物内吞。随后病毒基因组释放到胞质中,该过程中 CD163 起着决定性的作用^[18]。但对于 PRRSV 感染 Marc-145 细胞的机制则不清楚,因为 Marc-145 细胞不含唾液酸黏附素。

CD151 蛋白位于细胞膜上,属于四跨膜蛋白,在不同细胞中广泛表达,参与细胞支持、迁移和集合,在细胞内发挥着信号传导及细胞激活等功能。CD151 由于存在跨膜区,其疏水性较强,表达相对比较困难。本研究利用软件分析其表位集中部位,从 PRRSV 易感细胞系 Marc-145 中克隆得到了 CD151 的主要抗原结构 115-211 氨基酸区域,将该片段克隆入原核表达载体中进行了表达和纯化。纯化蛋白免疫小鼠获得了高特异性及高效价抗血清。用该抗体进行了病毒阻断试验,发现其在 1:5 及 1:10 稀释时能有效阻断 PRRSV 感染 Marc-145 细胞,该结果证明阻断 CD151 蛋白即可阻断 PRRSV 感染 Marc-145 细胞,提示 CD151 的 115-211 氨基酸区域在 PRRSV 感染 Marc-145 细胞发挥一定的作用。需要特别一提的是 CD163、唾液酸黏附素、硫酸乙酰肝素和波形蛋白的抗体均能阻断 PRRSV 的感染^[10-14],说明在 PRRSV 感染细胞时受体之间发挥协同作用,阻断其中任一受体就可切断 PRRSV 进入 Marc-145 细胞的路径,也进一步说明 PRRSV 感染细胞是一个涉及多个蛋白的复杂过程。

4 结 论

本研究成功克隆和表达了 Marc-145 细胞 CD151 重组蛋白,经纯化后免疫小鼠制备的高效价抗血清能够阻断 PRRSV 感染 Marc-145 细胞。这些结果表明 CD151 在 PRRSV 感染过程中起着重要作用。

参考文献:

[1] WENSVOORT G, TERPSTRA C, POL J M. Mys-

tery swine disease in the Netherlands: The isolation of Lelystad virus [J]. *Vet Q*, 1991, 13(3): 121-130.

[2] BAUTISTA E M, GOYAL S M, COLLINS J E. Serologic survey for Lelystad and VR-2332 strains of porcine respiratory and reproductive syndrome (PRRS) virus in US swine herds [J]. *J Vet Diagn Invest*, 1993, 5(4): 612-614.

[3] WENSVOORT G. Lelystad virus and the porcine epidemic abortion and respiratory syndrome [J]. *Vet Res*, 1993, 24(2):117-124.

[4] MEULENBERG J J, DE MEIJER E J, MOORMANN R J. Subgenomic RNAs of Lelystad virus contain a conserved leader-body junction sequence[J]. *J Gen Virol*, 1993, 74 (Pt 8):1697-1701.

[5] SHEN S, KWANG J, LIU W, et al. Determination of the complete nucleotide sequence of a vaccine strain of porcine reproductive and respiratory syndrome virus and identification of the Nsp2 gene with a unique insertion [J]. *Arch Virol*, 2000, 145(5):871-883.

[6] GODENY E K, CHEN L, KUMAR S N, et al. Complete genomic sequence and phylogenetic analysis of the lactate-dehydrogenase elevating virus (LDV) [J]. *Virol*, 1993, 194(2):585-596.

[7] LAROCHELLE R, MARDASSI H, DEA S, et al. Detection of porcine reproductive and respiratory syndrome virus in cell cultures and formalin-fixed tissues by in situ hybridization using a digoxigenin-labeled probe[J]. *J Vet Diagn Invest*, 1996, 8(1):3-10.

[8] BAUTISTA E M, GOYAL S M, YOON I J, et al. Comparison of porcine alveolar macrophages and CL 2621 for the detection of porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) virus and anti-PRRS antibody [J]. *J Vet Diagn Invest*, 1993, 5 (2): 163-165.

[9] KIM H S, KWANG J, YOON I J, et al. Enhanced replication of porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) virus in a homogeneous subpopulation of MA-104 cell line[J]. *Arch Virol*, 1993, 133 (3-4):477-483.

[10] DELPUTTE P L, COSTERS S, NAUWYNCK H J. Analysis of porcine reproductive and respiratory syndrome virus attachment and internalization: distinctive roles of heparin sulphate and sialoadhesin[J]. *J Gen Virol*, 2005, 86(Pt 5):1441-1445.

[11] 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: 4312-4321.
- [12] PATTON J B, ROWLAND R R, YOO D, et al. Modulation of CD163 receptor expression and replication of porcine reproductive and respiratory syndrome virus in porcine macrophages[J]. *Virus Res*, 2009, 140(1-2):161-171.
- [13] KIM J K, FAHAD A M, SHANMUKHAPPA K, et al. Defining the cellular target(s) of porcine reproductive and respiratory syndrome virus blocking monoclonal antibody 7G10 [J]. *J Virol*, 2006, 80: 689-696.
- [14] SHANMUKHAPPA K, KIM J K, KAPIL S, et al. Role of CD151, A tetraspanin, in porcine reproductive and respiratory syndrome virus infection[J]. *Virology*, 2007, 4: 62.
- [15] WRIGHT M D, GEARY S M, FITTER S. Characterization of mice lacking the tetraspanin superfamily member CD151 [J]. *Mol Cell Biol*, 2004, 24(13): 5978-5988.
- [16] STERK L M, GEUIJEN C A, OOMEN L C, et al. The tetraspan molecule CD151, a novel constituent of hemidesmosomes, associates with the integrin alpha6beta4 and may regulate the spatial organization of hemidesmosomes[J]. *J Cell Biol*, 2000, 149(4): 969-982.
- [17] VAN GORP H, VAN BREEDAM W, DELPUTTE P L, et al. Sialoadhesin and CD163 join forces during entry of the porcine reproductive and respiratory syndrome virus [J]. *J Gen Virol*, 2008, 89(12): 2943-2953.
- [18] VAN BREEDAM W, DELPUTTE P L, VAN GORP H, et al. Porcine reproductive and respiratory syndrome virus entry into the porcine macrophage [J]. *J Gen Virol*, 2010, 91: 1659-1667.

(编辑 白永平)