

## PRRSV 非结构蛋白 2-半胱氨酸结构域的原核表达及抗原表位预测

周 胜,高 歌,孙 荡,鲍梦雅,茅 翔  
(南京农业大学 动物医学院,江苏 南京 210095)

**摘要:**为了获得 PRRSV 非结构蛋白 2-半胱氨酸结构域的高纯度原核表达蛋白以及了解该蛋白的抗原表位,试验以从 PRRSV-VR2332 毒株上提取的病毒全基因组 RNA 为模板,通过 RT-PCR 扩增非结构蛋白 2-半胱氨酸结构域(Nsp2pro)基因,连接构建原核表达载体 SUMO-Nsp2pro,转入宿主菌 Rosetta2,经 IPTG 诱导,获得高浓度的可溶蛋白 Nsp2pro,经亲和层析 His-Bind 后得到高纯度的目的蛋白。同时,运用生物信息学方法对 Nsp2pro 二级结构及抗原表位进行预测。结果显示,Nsp2pro 的  $\alpha$  螺旋及  $\beta$  折叠区域较多,转角区域较少,结构较为复杂,位于蛋白分子表面且亲水的区段很可能是 B 细胞表位的优势区段。获得较高纯度的蛋白,将为后续进一步研究 Nsp2pro 基因编码的蛋白在病毒复制过程中的作用奠定基础。

**关键词:**PRRSV;Nsp2pro;基因克隆;原核表达;抗原表位预测

**中图分类号:**Q78

**文献标识码:**A

**文章编号:**1002-2767(2012)03-0025-04

猪繁殖与呼吸综合症(Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome,PRRS)是一种急性猪传染病。1987 年该病首次爆发于美国,2006 年 PRRS 在我国大部分省份流行起来,给养猪业造成了极大的损害<sup>[1]</sup>。高致病性猪蓝耳病是由猪繁

殖与呼吸综合症病毒变异株引起的一种急性高致死性疫病,临床表现为母猪繁殖障碍、呈现流产、死胎、木乃伊胎及弱仔等症状,仔猪及育成猪表现为呼吸系统困难等症状<sup>[1]</sup>。PRRSV 基因组约为 15 kb,含有 9 个开放阅读框 ORF,其中 ORF1 主要编码非结构蛋白。非结构蛋白 2(nonstructural protein 2,Nsp2)是 PRRSV 编码最大的非结构蛋白,在病毒复制过程中具有重要作用。其半胱氨酸结构域具有顺式和反式切割功能,顺式与反式功能的缺失会影响病毒的复制<sup>[2]</sup>。通过原核表达具有活性的半胱氨酸蛋白酶结构域,并能获得高纯度的蛋白质,接下来将在家兔身上进行多克隆

收稿日期:2011-12-12

基金项目:南京农业大学大学生创新资助项目(1004A04)

第一作者简介:周胜(1990-),男,江苏省盐城市人,在读学士,从事动物传染病预防研究。E-mail:1718418@njau.edu.cn。

通讯作者:茅翔(1972-),男,安徽省肥东市人,教授,博士生导师,从事重大动物疫病病原分子结构与功能的关系研究。E-mail:xmao@njau.edu.cn。

## Preliminary Study on Gene Transformation of Longdao No. 8 and Longdao No. 9 by *Bt* Gene

WANG Tong-tong,MENG Ying,ZHANG Xi-juan,TANG Ao,SUN Bing,DONG WEN-jun  
(Crop Tillage and Cultivation Institute of Heilongjiang Academy of Agricultural Sciences,  
Harbin,Heilongjiang 150086)

**Abstract:**In order to enhance resistance of rice,bacterial strain LBA4404 which contained two different types of plasmid pCDMAR-UBb-Hyg and pCDMAR-UBAC-Hyg modified *Cry1Ab* and *Cry1AC*+*SCK* separately were used as mediator to carry out locus modifying of Longdao No. 8 and Longdao No. 9. The results showed that conversion percentage of both the two plasmids were between 20% and 30%. But percentage of positive test for *Bt* protein showed a little difference.

**Key words:**rice;*Bt* gene;conversion percentage;differentiation rate

抗体的制备,为后续进一步研究 *Nsp2pro* 基因编码的蛋白在病毒复制过程中的作用奠定基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

供试材料为 PRRSV-VR2332 毒株(标准毒株);主要试剂及仪器为反转录试剂盒、PCR 仪、PCR 试剂盒、琼脂糖、电泳仪、高速冷冻离心机、DL-5000 Marker、微量移液器、*Xho* I 和 *Kpn* I 限制性内切酶、T<sub>4</sub> DNA 连接酶、胶回收试剂盒和去磷酸化试剂盒。

### 1.2 方法

1.2.1 引物的合成 根据 GenBank 上公布的 PRRSV *Nsp2pro* 基因序列,用 Primer Premier 5.0 设计 1 对特异引物,上游引物为:5'-CGGT-GAA GGTACC TACTCCCCGCCTGCCG-3' (下划线部分为 *Kpn* I 酶切位点),下游引物 5'-GCATCAG CTCGAG TTA CAAGGACTTTT-GAG-3' (下划线部分为 *Xho* I 酶切位点,双划线部分为终止密码子)。

1.2.2 PRRSV RNA 的提取 取 500  $\mu$ L 病毒悬液,加入 800  $\mu$ L Trizol 细胞裂解液振荡摇匀 5 min;加入 200  $\mu$ L 氯仿,剧烈振荡 1 min,室温下静置 5 min;4℃、12 000  $r\cdot\min^{-1}$  离心 15 min,吸取上清液,向其中加入等体积的异丙醇,颠倒摇匀,−20℃静置 2 h;室温静置 10 min,随后 4℃、12 000  $r\cdot\min^{-1}$  离心 20 min,除去上清液;向沉淀中加入 70%乙醇 1 mL,混匀,4℃、12 000  $r\cdot\min^{-1}$  离心 5 min;弃去液体,待管壁干燥后加入 20  $\mu$ L DEPC 处理过的超纯水溶解,得到 PRRSV 总 RNA。

1.2.3 PRRSV cDNA 的合成 总体系(20.0  $\mu$ L): PRRSV 总 RNA 5.0  $\mu$ L, 5× Buffer 4.0  $\mu$ L, 10 mmol·L<sup>−1</sup> dNTP 1.0  $\mu$ L, Amr 0.5  $\mu$ L, RNAsci 0.5  $\mu$ L, Random primer 1.0  $\mu$ L, 超纯水 8.0  $\mu$ L。反应条件:50℃反应 45 min;95℃反应 5 min。

1.2.4 *Nsp2pro* 基因的扩增 总体系(20.0  $\mu$ L): 病毒 cDNA 模板 2.0  $\mu$ L, 10 mmol·L<sup>−1</sup> dNTP 4.0  $\mu$ L, 10× Pfu Buffer 5.0  $\mu$ L, 上下游引物各 1.0  $\mu$ L, Pfu 酶 1.0  $\mu$ L, DEPC 处理水 36.0  $\mu$ L。在 PCR 仪内采用 Touchdown 方法扩增,条件为 90℃预变性 10 min;90℃变性 5 min, 78℃退火 1 min(退火温度从 78℃到 50℃共 29 个循环), 72℃延伸 1 min;然后 90℃变性 5 min, 55℃退火

1 min, 72℃延伸 1 min(25 个循环), 72℃延伸 10 min。核酸电泳鉴定,按胶回收试剂盒使用说明进行回收。

1.2.5 *Nsp2pro* 基因的克隆与鉴定 PCR 产物与 SUMO 载体分别双酶切。酶切目的基因体系(50.0  $\mu$ L): *Nsp2pro* 基因 26.0  $\mu$ L, 10× H Buffer 5.0  $\mu$ L, *Xho* I、*Kpn* I 各 2.0  $\mu$ L, 超纯水 15.0  $\mu$ L;酶切质粒体系(20.0  $\mu$ L): SUMO 载体 10.0  $\mu$ L, 10× H Buffer 2.0  $\mu$ L, *Xho* I、*Kpn* I 各 1.0  $\mu$ L, 超纯水 6.0  $\mu$ L。37℃恒温水浴反应 2 h。酶切产物做电泳鉴定,分别用胶回收试剂盒纯化目的条带。

质粒去磷酸化体系(50  $\mu$ L): CIAP 1.5  $\mu$ L, 超纯水 13.5  $\mu$ L, 10× Phosphatase Buffer 5.0  $\mu$ L, 质粒 30  $\mu$ L, 37℃恒温水浴反应 2 h。

连接体系(25.0  $\mu$ L): 10× T4 DNA Ligase Buffer 2.5  $\mu$ L, Ligase 1.0  $\mu$ L, *Nsp2pro* 基因 5.0  $\mu$ L, SUMO 载体 16.5  $\mu$ L, 4℃过夜。重组质粒转化 DH5 感受态细胞,涂布于含氨苄西林的平板上,37℃培养 18 h,挑取单个菌落, LB 试管扩大培养,提取质粒,然后进行双酶切鉴定,阳性质粒命名为 SUMO-Nsp2pro。

1.2.6 序列的测定 将 SUMO-Nsp2pro 质粒送华大基因进行序列测定。

1.2.7 SUMO-Nsp2pro 原核表达及纯化 将阳性质粒 SUMO-Nsp2pro 转化宿主菌 Rosetta2, 无菌条件下加入到含氨苄霉素的 LB 培养皿中, 37℃温箱保存过夜,挑取单个菌落至 LB 培养液中, 37℃振荡培养至 OD<sub>600</sub> 值为 0.6 左右,使其终浓度为 1.0 mmol·L<sup>−1</sup>。分别取 1 和 5 mL 培养液到 EP 管和新的 LB 培养液中作为对照组和菌种, 试管中加入 1.5  $\mu$ L IPTG 诱导剂, 22℃继续振荡培养过夜。收集菌液在 12 000  $r\cdot\min^{-1}$  条件下离心 10 min, 弃上清液, 将沉淀悬浮于 1× SDS-PAGE 凝胶上样缓冲液中, 进行超声波裂解后, 12 000  $r\cdot\min^{-1}$  离心 5 min。对照组弃上清, 用 100  $\mu$ L SDS-PAGE 凝胶上样缓冲液悬浮后标记为 1 号;菌液取 100  $\mu$ L 上清标记为 2 号;弃去上清, 沉淀用 100  $\mu$ L SDS-PAGE 凝胶上样缓冲液悬浮后, 标记为 3 号, 然后进行 SDS-PAGE。

大剂量诱导表达蛋白,使用 His-Bind Purification Kit 进行纯化,具体操作按 His-Bind 纯化试剂盒说明书进行,利用 SDS-PAGE 对纯化蛋白进行鉴定。

1.2.8 Nsp2pro 抗原表位分析 采用 DNASTar 软件提供的 Protean 模块对 Nsp2pro 蛋白的 B 细胞抗原表位进行预测。分别以 Garnier-Robson 法、Chou-Fasman 法预测其二级结构,以 Karplus-Schulz 法预测其柔性区域,以 Kyte-Doolittle 方法进行亲水性区域分析,以 Emini 方案进行氨基酸位于分子表面可能性分析,以 Jameson-Wolf 法进行抗原指数分析。

## 2 结果与分析

### 2.1 PRRSV *Nsp2pro* 基因扩增结果

RT-PCR 检测结果表明,在 831 bp 处出现的特异性条带与预期结果一致(见图 1)。

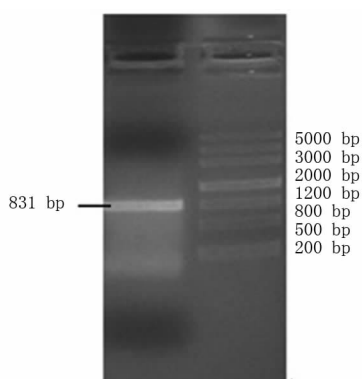


图 1 PCR 扩增结果

Fig. 1 PCR result of *Nsp2pro*

### 2.2 重组质粒酶切鉴定分析

SUMO-Nsp2pro 重组质粒双酶切,可以切出较大片段的质粒和 *Nsp2pro* 基因片段(见图 2)。

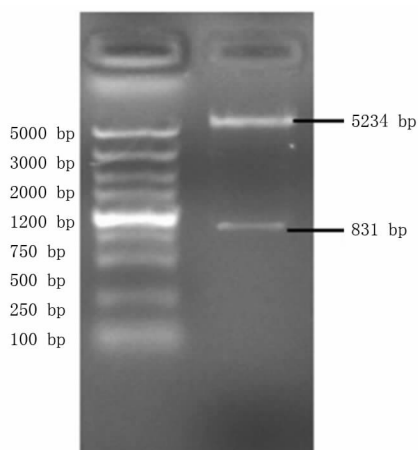


图 2 SUMO-Nsp2pro 重组质粒 *Kpn* I 和 *Xho* I 双酶切鉴定

Fig. 2 Identification of recombinant plasmid

SUMO-Nsp2pro digested by *Kpn* I and *Xho* I

### 2.3 SUMO-Nsp2pro 的小剂量表达结果

重组质粒 SUMO-Nsp2pro 转化 Rosetta2 大

肠杆菌中,经 IPTG 诱导后,SDS-PAGE 的电泳结果表明,SUMO-Nsp2pro 为可溶性蛋白(见图 3)。大小约为 49 kD,与预期相一致。

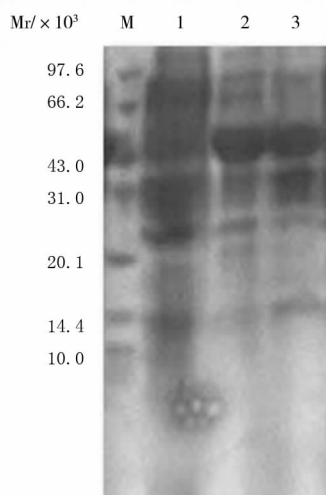


图 3 表达蛋白 SUMO-Nsp2pro 的 SDS-PAGE 的电泳结果

M: 标准蛋白;1:对照组超声波裂解沉淀;2:超声波裂解上清;3:超声波裂解沉淀

Fig. 3 Result of expressed product by SDS-PAGE

M: Protein marker; 1: Precipitate of the lysate of control;

2: Supernatant of the lysate; 3: Precipitate of the lysate

### 2.4 纯化蛋白 SUMO-Nsp2pro 的 SDS-PAGE 结果

表达的融合蛋白用 His-Bind 纯化试剂盒进行纯化,取前 6 管收集液 20  $\mu$ L 进行 SDS-PAGE 电泳,结果在 49 kD 左右出现表达量较大的蛋白条带,杂蛋白很少,表明纯化良好(见图 4)。

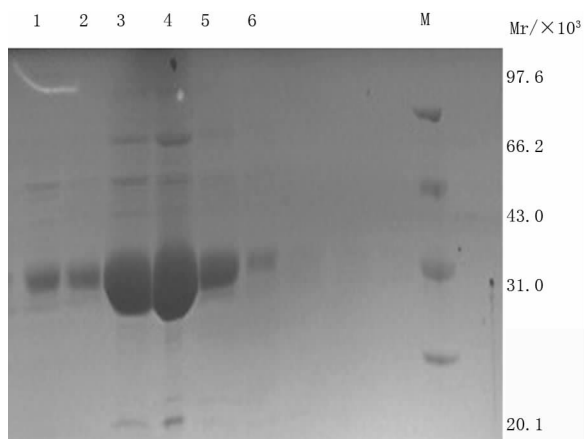


图 4 纯化蛋白 SUMO-Nsp2pro 的 SDS-PAGE 电泳结果

M: 标准蛋白;1~6:SUMO-Nsp2pro 的纯化结果

Fig. 4 Result of purified protein by SDS-PAGE

M: Protein marker; 1~6: purified protein

### 2.5 Nsp2pro 的二级结构预测

分别以不同的方法 (Garnier-Robson 法、Chou-fasman 法) 预测 Nsp2pro 的二级结构, 可看出其上  $\alpha$  螺旋及  $\beta$  折叠区域较多, 转角区域较少, 结构较为复杂。两种方法预测共有的  $\alpha$  螺旋区域主要集中在 19~22 位, 40~50 位, 69~79 位, 123~131 位, 136~142 位, 204~212 位, 220~230 位; 共有的  $\beta$  折叠区域在 12~16 位, 80~83

位, 155~167 位, 177~190 位, 202~203 位, 213~216 位, 237~239 位, 244~247 位, 257~260 位, 267~275 位; 共有的转角在 4~11 位, 37~39 位, 62~63 位, 102~106 位, 149~150 位, 168~171 位, 191~198 位。Karplus-Schulz 法预测其柔性区域结果显示 Nsp2pro 上含有大量的柔性区域, 其中较大的几个柔性区域分别位于 23~45 位, 145~156 位, 195~206 位, 253~263 位 (见图 5)。

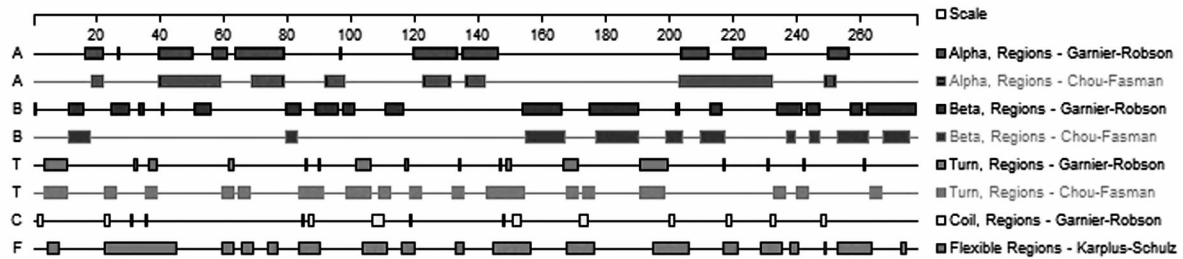


图 5 不同方法预测 Nsp2pro 的二级结构

A.  $\alpha$  螺旋区域; B.  $\beta$  折叠区域; T. 转角区域; C. 柔性区域

Fig. 5 Result of the secondstructure prediction by different means

A: Alpha regions; B: Beta regions; T: Turn regions; C: flexible regions

### 2.6 Nsp2pro 的 B 细胞抗原表位预测

按照 Kyte-Doolittle 的氨基酸亲水性标准, Nsp2pro 具有较高的亲水性, 主要包括第 1~12、21~48、145~154、166~178、194~208、226~242 区段; 根据 Emini 原则分析表面可及性, 结果显示 Nsp2pro 中表面可及性较高的区域主要分布在第

25~42、147~151、196~203、229~233 区段, 而且这些区段都位于亲水性区域; Jameson-Wolf 法预测 ORF1 编码蛋白抗原指数的结果表明, Nsp2pro 的亲水性区域抗原指数都很高 (见图 6)。综合预测结果, Nsp2pro 上位于蛋白分子表面且亲水的区段很可能是 B 细胞表位的优势区段。

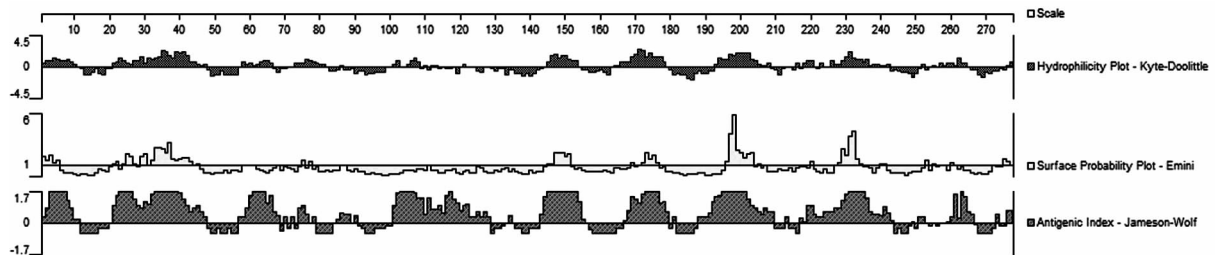


图 6 Nsp2pro 的亲水性、抗原指数及表面可及性分析

Fig. 6 Result of hydrolicity, surface probability and antigen index of Nsp2pro

## 3 结论与讨论

Nsp2 是 PRRSV 基因编码的最大非结构蛋白, 其在病毒复制过程中起到重要的作用。编码 Nsp2pro 的基因具有高度保守性, 该段基因的缺失或者置换将降低病毒的复制能力。该试验通过 PCR 方法扩增 Nsp2pro 目的片段, 连接构建原核表达载体 SUMO-Nsp2pro, 转入到宿主菌 Rosetta2 感受态细胞, 经过双酶切及测序鉴定, 阳性质粒用于原核表达。经 IPTG 诱导, 获得高浓度的可溶蛋白 Nsp2pro, 经 SDS-PAGE 鉴定, 在 49 kD 左右得到高

纯度的目的蛋白。Nsp2pro 二级结构及抗原表位进行预测的结果表明 Nsp2pro 空间结构较为复杂, 位于蛋白分子表面且亲水的区段很可能是 B 细胞表位的优势区段。

2006 年 PRRS 在我国大部分省份流行起来, 给养猪业造成了极大的损害<sup>[3]</sup>。目前除了免疫接种 PRRSV 疫苗外, 还没有有效的抗病毒药物治疗该疾病。进一步的试验证明, 目前的只基于一种毒株的疫苗不能或只能部分对同源病毒有效<sup>[4-5]</sup>。因此在开发新型疫苗的同时, 对于能够抑制病毒的小

分子抑制剂的开发也是防控 PRRSV 的重要研究方向<sup>[6]</sup>。一般来说,能够阻碍病毒侵入机体、病毒增殖、包装及出胞的任何过程都可以作为抗病毒药物设计的靶点。Nsp2 是猪繁殖与呼吸综合症病毒编码的最大的非结构蛋白,其半胱氨酸蛋白酶正确切割 nsp2~3 之间的连接以及自身,是病毒复制的关键<sup>[7,9-10]</sup>。该试验主要对 PRRSV 的 *Nsp2pro* 基因进行了分子克隆和鉴定<sup>[8]</sup>,为该片段蛋白的表达提供了基础。通过原核表达分离纯化蛋白,得到高纯度的蛋白。如果能够获得晶体,将可以通过 X-晶体衍射解析蛋白空间结构,找出适合小肽作用的靶位点,从而抑制病毒的活性,可为抗病毒药物的设计提供基础。

#### 参考文献:

- [1] 秦爱建,韦平. 重要动物病毒分子生物学[M]. 北京:北京科学出版,2008.
- [2] Jun Han MSR,Kay S Faberg. The porcine reproductive and respiratory syndrome virus Nsp2 cysteine protease domain possesses both trans- and cis-cleavage activities[J]. Journal of Virology,2009,83(18):9449-9463.
- [3] 严景华,瞿李侯. Expression and purification of porcine reproductive and respiratory syndrome virus Nsp2 protein and analysis of cleavage activity [J]. 微生物学报,2009,49(11):1502-1508.
- [4] de lima M PAK,Flores E F,Osorio F A. Mapping of B-cell linear epitopes on Nsp2 and structural proteins of a North American strain of porcine reproductive and respiratory syndrome virus[J]. Virology,2006,353:310-421.
- [5] Ying Fang JC-H,Elizabeth Brown, Liu Haixia, et al. Development of genetic markers in the nonstructural protein 2 region of a US type 1 porcine reproductive and respiratory syndrome virus; implications for future recombinant marker vaccine development[J]. Journal of General Virology,2008,89:3086-3096.
- [6] 毛君婷,周碧君,史开志. Prrsv 特种野猪分离株 *Nsp2* 基因序列分析和疫苗免疫效果[J]. 畜牧与兽医,2009(10):88-90.
- [7] Oleksiewicz MB BA, Toft P, Normann P, et al. Epitope mapping porcine reproductive and respiratory syndrome virus by phage display; the Nsp2 fragment of the replicase polypeptide contains a cluster of B-cell epitopes[J]. J. Virol,2001,75(7):3277-3290.
- [8] 郭杨,陈世界,林华. 高致病 PRRSV Nsp2 变异株 Power SYBR Green real time RT-PCR 检测方法的建立[J]. 中国兽医科学,2009,39(5):410-415.
- [9] Eric J, Snijder HvT, Norbert Roos, Ketil W Pedersen. Non-structural proteins 2 and 3 interact to modify host cell membranes during the formation of the arterivirus replication complex[J]. Journal of General Virology,2001,82:985-994.
- [10] 邱德新,陈焕春. 猪繁殖与呼吸综合征(PRRS)弱毒活疫苗的安全性 and 体液免疫研究[J]. 华中农业大学学报,2004,23(4):437-441.

## The Gene Clone, Prokaryotic Expression and Antigen Epitopes Prediction of the Cysteine Domain of Nonstructural Protein 2 of PRRSV

ZHOU Sheng, GAO Ge, SUN Dang, BAO Meng-ya, MAO Xiang

(Veterinary Medicine College of Nanjing Agricultural University, Nanjing, Jiangsu 210095)

**Abstract:** In order to acquire highly purified protein of cysteine domain of nonstructural protein 2 of PRRSV and acquaintance its antigen epitopes, the experiment were conducted with the genome extracted from PRRSV-VR2332 and got the gene of the cysteine domain of nonstructural protein 2 of PRRSV(Nsp2pro) by RT-PCR. Then, a recombinant plasmid named SUMO-Nsp2pro had been constructed, and then transformed SUMO-Nsp2pro into Rosetta2. Therefore, a large amount of Nsp2pro was obtained by IPTG. In the end, Nsp2pro was purified by His-Bind affinity chromatography, meanwhile predicted the second structure and antigen epitopes through means of bio-information, the results showed that Nsp2pro owned a great many Alpha regions and Beta regions while few of turn regions. The antigen epitopes were located in hydrophilicity regions possibly. The obtained high purified protein would provide foundations for the further researches on Nsp2pro gene.

**Key words:** PRRSV; Nsp2pro; gene clone; prokaryotic expression; antigen epitopes prediction