

PRRSV 陕西分离株 *ORF3* 基因的克隆、序列分析及原核表达载体的构建

张 琦¹,王 菡¹,黎 径¹,梁 靛¹,许信刚²

(1. 陕西出入境检验检疫局检验检疫技术中心,西安 710068;2. 西北农林科技大学 动物医学院,陕西杨凌 712100)

摘 要: 根据 GenBank 公布的 PRRSV *ORF3* 基因的核苷酸序列,设计并合成一对特异性引物,用 RT-PCR 方法扩增 PRRSV 陕西分离株 *ORF3* 基因,将其克隆入 pGEM-T 载体中,测序并进行序列分析。再将 *ORF3* 基因亚克隆入 pET-32a 中,构建原核表达载体。结果扩增到 765 bp 的 PRRSV 全长 *ORF3* 基因,序列分析结果表明,分离株与 SY0608 亲缘关系较近,而与 CH-2、HB-2 关系较远。重组原核表达质粒经酶切鉴定正确后命名为 pET-GP3,为进一步研究 GP3 蛋白的原核表达、免疫特性、结构与功能奠定了基础。

关键词: 猪繁殖与呼吸综合征病毒;陕西分离株;*ORF3* 基因;序列分析;原核表达载体

中图分类号:Q786 文献标识码:A 文章编号:1004-1389(2010)10-0021-06

Cloning, Sequence Analysis and Construction of Prokaryotic Expression Vector of *ORF3* Gene of PRRSV Shaanxi Strain

ZHANG Qi¹, WANG Han¹, LI Jing¹, LIANG Liang¹ and XU Xingang²

(1. Inspection and Quarantine Technical Centre, Shaanxi Entry-Exit Inspection and Quarantine Bureau of the People's Republic of China, Xi'an 710068, China; 2. College of Veterinary Medicine, Northwest A&F University, Yangling Shaanxi 712100, China)

Abstract: According to the published complete nucleotide sequence of PRRSV (Porcine reproductive and respiratory syndrome virus) in GenBank, a pair of primers specific to the full-length of *ORF3* gene encoding the envelope glycoprotein GP3 were designed. The *ORF3* gene fragment amplified by RT-PCR was cloned into pGEM-T vector. The recombinant plasmid was sequenced and *ORF3* gene was compared with GenBank's other PRRSV strains. Then the gene was cloned into vector pET-32a for prokaryotic expression in *E. coli*. The result showed the *ORF3* gene of Shaanxi strain is 765 bp in full-length and encodes 254 amino acids. The sequence analysis indicated that the identity of nucleotide sequence and amino acid sequence is high between strains isolated both in our country and others. The Shaanxi strain has high homology with SY0608 in nucleotide level, whereas it has relatively low homology with CH-1 and HB-2. After the correct identification by enzyme digestion, *ORF3* gene was cloned into efficient expression vector pET-32α, the correct clone was named pET-ORF3 by enzyme digestion. The results established fundament to further expressing GP3 protein of PRRSV of efficient expression vector in *E. coli* BL21 cells and studies of its immunological characteristics, the structure and function.

Key words: Porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV); Shaanxi strain; *ORF3*; Sequence analysis; Prokaryotic expression

* 收稿日期:2010-02-24 修回日期:2010-06-15
基金项目:陕西省自然科学基金项目(2006C111);陕西省科技攻关项目(2009K02-01)。
第一作者:张 琦,男,工程师,硕士,主要从事出入境物品的卫生检验检疫工作。E-mail:zh2003ciq@qq.com
通讯作者:许信刚,男,博士,副教授,主要从事分子病原学与免疫学研究。E-mail:xuxingangzhangqi@yahoo.com.cn

猪繁殖与呼吸综合征(Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome, PRRS)是由猪繁殖与呼吸综合征病毒(Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus, PRRSV)引起的以母猪晚期流产、早产、死胎、木乃伊胎等繁殖障碍和仔猪严重的呼吸道症状及高死亡率为特征的传染病^[1-2]。该病毒主要侵害宿主免疫系统,可产生混合感染和继发感染,具有抗体依赖性增强作用,且易发生变异重组,对世界养猪业造成极大的经济损失^[3-4]。病原学研究表明,PRRSV为有囊膜的单股正链RNA病毒,其核酸大小约为15 kb,含9个开放阅读框(ORFs)。由ORF3编码的GP3蛋白是PRRSV的次要结构蛋白,是一种糖基化蛋白,在病毒的致病性、病毒复制、病毒装配、病毒变异和保护性反应等方面具有重要意义^[5-6]。GP3蛋白有可能与诱导细胞免疫有关,可作为研制PRRSV基因工程疫苗的候选保护性抗原之一^[7]。本试验通过对PRRSV陕西分离株ORF3基因克隆、序列分析并进行原核表达载体的构建等研究,为今后PRRSV疫苗开发、诊断试剂盒的研制及应用奠定基础。

1 材料与方法

1.1 病毒、菌种与质粒

PRRSV陕西分离株由陕西出入境检验检疫局检验检疫技术中心从陕西某猪场疑似猪繁殖与呼吸综合征发病仔猪中分离并经过鉴定保存;pGEM-T购自Promega公司;大肠杆菌DH5 α 、BL21及pET-32a质粒均为陕西出入境检验检疫局检验检疫技术中心保存。

1.2 主要试剂

TRIzol Reagent购自Invitrogen公司;反转录酶(AMV)购自Promega公司;HRP标记羊抗猪IgG购自北京天根生物技术有限公司;各种内切酶、T₄ DNA连接酶、Taq DNA多聚酶、dNTP分别购自Promega公司;DL2000 DNA Marker、DNA胶回收试剂盒购自上海生工生物工程技术服务有限公司;PRRSV阳性血清由西北农林科技大学动物医学院兽医微生物实验室惠赠;其他试剂均为国产分析纯。

1.3 引物设计与合成

根据GenBank上发表的PRRSV ORF3基因组序列,利用Primer 5.0软件设计1对特异性引物(P1/P2)。上游引物P1: 5'-GCTCTC

GAGATGGCTAATAGCTGTACA -3', 5'端加上BamHI酶切位点。下游引物P2: 5'-GGGCT-GCAGTCGCCGTGCGGCACT -3', 5'端加上XhoI酶切位点。扩增片断为765 bp,含有完整的ORF3基因,引物由上海生工生物工程技术服务有限公司合成。

1.4 病毒基因组的提取

取出一80℃保存的PRRSV细胞毒,按照TRNzol试剂说明书提取病毒RNA。

1.5 RT-PCR

取RNA作模板3 μ L,加入ORF3下游引物P2 1 μ L、dNTP 4 μ L、Rnase-Inhibitor 0.5 μ L、AMV 0.5 μ L、5 $\times$ AMV Buffer 4 μ L,加DEPC H₂O至20 μ L,42℃ 1h,即得cDNA模板;PCR反应体系如下:10 $\times$ PCR Buffer 5 μ L、dNTPs 4 μ L、P1/P2各1 μ L、rTaq 1 μ L、cDNA 6 μ L、加水至50 μ L。反应程序:95℃变性5 min;94℃ 1 min,56℃ 1 min,72℃ 1 min,共30个循环;最后72℃延伸10 min。反应结束后取10 μ L PCR产物加入1 μ L 6 $\times$ Loading Buffer于8 mg/mL琼脂糖凝胶中电泳,分析扩增产物。

1.6 PCR产物的纯化与回收

参照上海生工生物工程技术服务有限公司UNIQ-10胶回收试剂盒说明书回收目的基因片断,于16℃与pGEM-T载体过夜连接,转化DH5 α 感受态细胞,挑选阳性克隆,提取质粒,并用XhoI和BamHI双酶切鉴定,将鉴定正确的质粒送上海生工生物工程技术服务有限公司测序。测序结果应用DNASTAR分析软件与GenBank中的PRRSV ORF3序列进行比较分析并绘制系统进化树。

1.7 原核表达载体的构建和鉴定

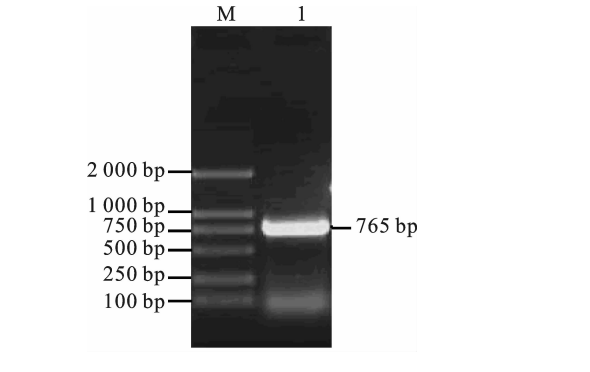
将阳性重组质粒pGEM-ORF3用BamHI和XhoI双酶切后回收并纯化,与同样双酶切的原核表达载体pET-32a(+)进行连接,得到重组原核表达载体pET-ORF3,用此质粒转化大肠杆菌DH5 α 工程菌,筛选阳性克隆,扩增,用酶切法鉴定重组质粒,并将鉴定正确的质粒送上海生工生物工程技术服务有限公司测序,以确证ORF3基因插入的正确性。

2 结果与分析

2.1 RT-PCR扩增结果

以PRRSV总RNA为模板,利用特异性引物

P1/P2 进行 PCR 扩增完整 *ORF3* 基因,产物经 8 mg/mL 琼脂糖凝胶电泳检测,得到 1 条大约 765 bp 的特异性条带,与预期片段大小相符(图 1)。



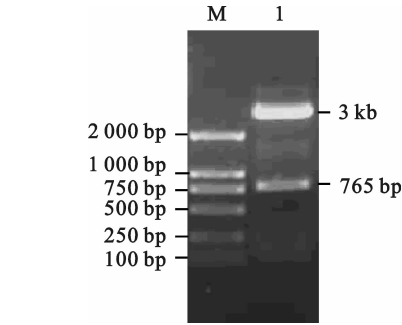
M. DNA 标准 DL2000 DL2000 DNA Marker; 1. Shaanxi 株 *ORF3* 基因 PCR 产物 PCR products of *ORF3* gene Shaanxi strain

图 1 RT-PCR 扩增 Shaanxi 株 *ORF3* 基因产物

Fig. 1 PCR products of *ORF3* gene of Shaanxi strain

2.2 重组质粒的酶切鉴定

重组质粒 pGEM-ORF3 用 *Bam*H I 和 *Xho*I 双酶切进行鉴定,结果切出 765 bp 条带(图 2),与预计的 *ORF3* 基因大小相符合。



M. DNA 标准 DL2000 DL2000 DNA Marker; 1. pGEM-*ORF3* 重组质粒的 *Bam*H I 和 *Xho*I 双酶切产物 Identification of recombinant pGEM-*ORF3* plasmid by digestion with *Bam*H I and *Xho*I

图 2 重组质粒 pGEM-ORF3 的双酶切鉴定结果

Fig. 2 Double enzyme digestion identification of recombinant plasmid pGEM-ORF3

2.3 ORF3 基因测序结果

重组质粒 pGEM-ORF3 由上海生工生物工程技术有限公司测序。Shaanxi 株*ORF3* 基因的全序列为 765 bp,共编码 254 个氨基酸,其核苷酸序列和氨基酸序列分别见图 3 和图 4。

ATGGCTAATAGCTGTACATTCCTCCATATTTTCCTCCGTTGCAGCTTCTTGTACTCTTTTTG
TTGTGCTGTGGCTGCGAATTCGAATGCTACGTTCTGTTTTGGTTTCCGCTGGTCAGGGG
CAACTTTTCTTTGAGCTCATGGTGAATTACACGGTATGCCCGCTTTGCCAACCCGGCA
GGCAGCCGCTGAGATCCTTGAACCCGGCAGGTCTTTTTGGTGCAGGATAGGGCATGACC
GATGTAGTGAGAACGATCATGACGAAGTGGTTCATGGTTCCGCTGGCCTCTCCAGC
GAAGGCCACTTGACCAAGTGTTCACGCCTGGTTGGCGTTCCTGTCCTTCAGCTACACGGC
CCAGTTCCATCCCAGATATTTGGGATAGGGAATGTGAGTCAAGTTTATGTTGACATCAA
GCACCAATTCATCTGCGCTGTTACGACGCGGATAACACCACCTTGCCCTCGCCATGACA
ATATTCAGCCGTATTTTCAGACCTACTACCAACACCAGGTGCGCGGCAATTGGTTTC
ACCTGGAATGGCTGCGCCCTTTCTTTCTCTTGGTTGGTTTAAATGTTTCGTGGTTTCT
CAGGCGTTCGCTGCAAGCCATGTTTCAGTTCGAGTCTTTCGACATCAAAACCAACAC
CACCGCAGCATCAGACTTCTGTGCTCCAGGACATCAGCTGCCTTAGGCATGGCGACT
CGTCTCTCCGACGATTCGCAAAAGTTCTCAGTGCCGCACGGCGATAG

图 3 Shaanxi 株 *ORF3* 基因的核苷酸序列

Fig. 3 The nucleotide sequence of *ORF3* gene of Shaanxi strain

MANSTFLHIFLRCSFLYSFCCAVAANSNATFCFWPLVRGNFSFELMVNYTVCLPCPTRQAAA
EILEPGRSFWCRIGHDRCSNDHDELGFMPVPPGLSSEGHLSVYAWLAFLSFSYTAQFHPEIFGI
GNVSQVYVDIKHQFICAVHDGDNNTLPRHDNISAVFQTYQHQVDGGNWFHLEWLRPFSSW
LVLNVSWFLRRSPASHVSVRVFRTSKPTPPQHQTSLSSRTSALGMATRPLRRFAKVLSAARR

图 4 Shaanxi 株 GP3 蛋白氨基酸序列

Fig. 4 The amino acid sequence of GP3 protein of Shaanxi strain deduced from *ORF3* gene

2.4 同源性分析

应用 DNASTar 分析软件将测得 *ORF3* 序列与国内外已知序列的基因及预测编码氨基酸序列进行比较。参考毒株登陆号分别为: BJsy06 (EU097707)、CH-2 (AY262352)、GDZC1

(AY858585)、HB-1 (EU360130)、HB-2 (AY262352)、Henan-1 (EU200962)、JX143 (EU708726)、JXA1 (FJ548855)、LN (EU109502)、NX06 (EU097706)、SHH (EU097706)、SY0608 (EU144079)、WuH1

(EU187484)。其中 CH-1a 为国内分离的第 1 株毒, HB-1、HB-2 为早期分离的河北毒株, JXA1 为国内 2006 年以来主流行毒株。HN1 为 2006 年以前国内分离株。序列分析显示: Shaanxi 株

与 SY0608 亲缘关系最近, 核苷酸同源性达 99.3%, 氨基酸同源性达 98.8%, 而与 CH-2、HB-2 关系相对远些, 核苷酸同源性为 93.3%, 氨基酸同源性为 91.4%(图 5)。

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	
1		96.1	93.6	97.5	97.8	93.6	99.5	99.5	99.5	99.3	100.0	99.2	99.6	99.9	98.8	1
2	4.1		96.5	96.9	97.0	96.5	95.8	95.8	96.1	95.7	96.1	95.8	96.0	96.2	95.2	2
3	6.8	3.6		94.4	94.3	100.0	93.6	93.3	93.6	93.2	93.6	93.3	93.5	93.7	92.7	3
4	2.5	3.2	5.9		99.2	94.4	97.3	97.3	97.3	97.1	97.5	97.3	97.4	97.7	96.6	4
5	2.3	3.1	6.1	1.9		94.3	97.5	97.5	97.5	97.4	97.8	97.5	97.7	97.9	96.9	5
6	6.8	3.6	0.0	5.9	6.1		93.6	93.3	93.6	93.2	93.6	93.3	93.5	93.7	92.7	6
7	0.5	4.3	8.8	2.8	2.5	6.8		99.2	99.2	99.1	99.5	99.0	99.3	99.6	98.6	7
8	0.5	4.3	7.1	2.8	2.5	7.1	0.8		99.2	99.1	99.5	99.0	99.3	99.6	98.6	8
9	0.5	4.1	6.8	2.8	2.5	6.8	0.8	0.8		99.3	99.5	99.0	99.6	99.6	98.6	9
10	0.7	4.5	7.2	2.9	2.7	7.2	0.9	0.9	0.7		99.3	99.8	99.5	99.5	99.7	10
11	0.0	4.1	6.8	2.5	2.3	6.8	0.5	0.5	0.5	0.7		99.2	99.6	99.9	98.8	11
12	0.8	4.3	7.1	2.8	2.5	7.1	1.1	1.1	1.1	1.2	0.8		99.1	99.3	98.3	12
13	0.4	4.2	6.9	2.7	2.4	6.9	0.7	0.7	0.4	0.5	0.4	0.8		99.7	98.7	13
14	0.1	3.9	6.6	2.4	2.1	6.6	0.4	0.4	0.4	0.5	0.1	0.7	0.3		99.0	14
15	1.2	5.1	7.8	3.5	3.2	7.8	1.5	1.5	1.5	1.3	1.2	1.7	1.3	1.1		15

BJsy06(EU097707)

CH-1a

CH-2(AY262352)

GDZC1(AY858585)

HB-1(EU360130)

HB-2(AY262352)

Henan-1(EU200962)

JX143(EU708726)

JXA1(FJ548855)

LN(EU109502)

NX06(EU97706)

Shaanxi

SHH(EU097706)

SY0608(EU144079)

WuH1(EU187484)

图 5 Shaanxi 株 ORF3 基因与其他毒株核苷酸同源性比较

Fig. 5 Comparison of nucleotide sequence of ORF3 gene between Shaanxi and other strains

2.5 进化树分析

在分析 PRRSV Shaanxi 株同源性的基础上进行核苷酸遗传进化分析, 并绘制其系统发生进化树(图 6)。从图中可以看出, Shaanxi 株与

SY0608 (EU144079) , WuH1 (EU187484) , BJsy06(EU097707), NX06(EU097706)等同位于一个小分支, 亲缘关系较近。

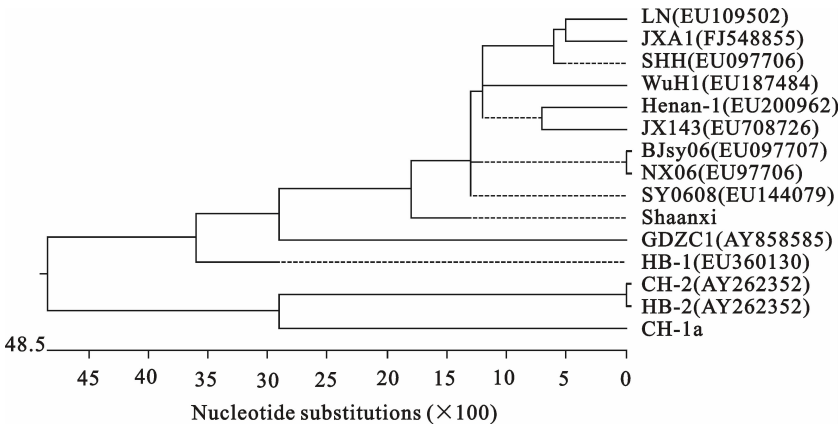
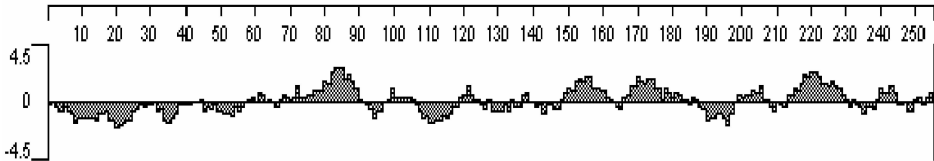


图 6 ORF3 基因系统进化树

Fig. 6 The phylogenetic tree of PRRSV ORF3 gene



图中横坐标表示氨基酸残基, 纵坐标表示氨基酸的亲水值, 亲水性位于横坐标上方, 疏水性位于下方 In this Picture X-axis represents amino acid residues; Y-axis indicates hydropathicity, hydrophilic region is located above the X-axis and the hydrophobic is located under the X-axis

图 7 PRRSV Shaanxi 株 GP3 多肽亲水性分析

Fig. 7 Hydropathicity of PRRSV GP3 protein of Shaanxi strain

2.6 GP3 蛋白性质分析

DNAstar 软件疏水性分析表明:Shaanxi 株 GP3 蛋白的第 0~31,38~49,64~99,107~130、176~191 位为疏水性区域,并且在第 0~31、64~99、107~130 位氨基酸区段存在大的疏水性区域



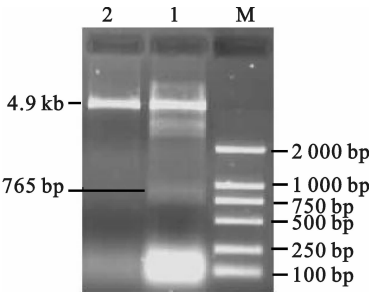
横轴为氨基酸残基数,纵轴为相邻 7 个氨基酸的平均抗原性值,抗原区位于横坐标上方,非抗原区位于横坐标下方。
X-axis represents amino acids residues; Y-axis indicates the average antigenicity of seven amino acids nearby; antigen region is located above the X-axis and non-antigen region is located above the Y-axis.

图 8 PRRSV Shaanxi 株 GP3 多肽抗原表位分析

Fig. 8 Antigenicity of PRRSV GP3 protein of Shaanxi strain

2.7 原核重组表达载体酶切鉴定结果

对重组表达质粒 pET-ORF3 用 *Eco*RI 和 *Xho*I 双酶切进行鉴定,结果切出两条带,大小分别为 4.9kb 和 765bp。结果表明,目的基因已连接到 pET-32α 原核表达载体上(图 9)。



M. DNA 标准 DL2000 DL2000 DNA Marker;1. pET-ORF3 重组质粒的 *Eco*R I 和 *Xho* I 双酶切产物 Identification of recombinant pET-ORF3 plasmid by digestion with *Eco*R I and *Xho* I ; 2. pET-32a 质粒 *Bam*HI 和 *Xho* I 双酶切阴性对照 pET-32a plasmid negative control group

图 9 重组表达质粒 pET-ORF3 的双酶切鉴定结果

Fig. 9 Double enzyme digestion identification of recombinant plasmid pET-ORF3

3 讨论

3.1 ORF3 基因序列分析

用 PCR 的方法成功扩增出 PRRSV *ORF3* 基因,序列测定结果表明,该基因大小为 765 bp,编码 254 个氨基酸。将 *ORF3* 基因与国内外发表的毒株进行同源性分析,该毒株与其他毒株核苷酸的同源性为 93.3%~99.3%,说明 Shaanxi 株 *ORF3* 基因的变异不大,本研究结果对猪繁殖与呼吸综合症病毒病的防制有一定意义。从遗传

(图 7)。

由图 8 可知,Shaanxi 株 *ORF3* 基因编码产物 GP3 蛋白有 6 个潜在抗原表位,主要位于 30~38、48~57、126~134、135~142、146~156、159~187 位氨基酸,具有较强的抗原性。

进化树上,Shaanx 分离株与 SY0608 (EU144079)、WuH1 (EU187484) 同位于一个小分支,亲缘关系最近。推测 Shaanxi 株属国内毒株在流行过程中的变异毒株,可能有共同来源。从目前报道的情况来看,国内的 PRRSV 毒株大部分与美洲型代表株同源性较高,说明在中国流行的 PRRSV 以美洲型亚群为主。

3.2 疏水性、抗原表位分析

由抗原疏水性图(图 7)及抗原性图(图 8)的曲线走向可以看出,抗原性峰值基本与亲水性峰值趋同,也就是说氨基酸序列亲水性越强的部位,抗原表位位于此区域的可能性就越大,而与疏水性曲线则表现出相反的走向。氨基酸的疏水性可作为判定该蛋白是否为跨膜蛋白的指标,特别是在一段多肽中如果能够发现几个亲、疏水区相间隔存在的情况,一般可作为跨膜蛋白的标识,而跨膜蛋白往往是受体等的作用位点。因此,疏水区和跨膜区对于分析一个蛋白质的性质功能具有一定的意义。分析显示,PRRSV Shaanxi 株 GP3 蛋白在 0~31、38~49、64~99、107~130、176~191 位为疏水性区域,并且在 0~31、64~99、107~130 位氨基酸区段存在大的疏水性区域。这些结果对该分离株 GP3 蛋白的初步了解及为 GP3 蛋白体表达和结构功能的研究奠定基础。

3.3 ORF3 基因原核表达载体的构建

由 *ORF3* 编码的 GP3 蛋白,在病毒的致病性、病毒复制、病毒装配、病毒变异和保护性反应等研究方面具有重要意义。GP3 亚单位疫苗的研究结果显示,接种猪体内并不存在可检测的中和抗体,但它可为母猪提供一定的保护,提示

GP3 蛋白有可能与诱导细胞免疫有关,可作为研制 PRRSV 基因工程疫苗的候选保护性抗原之一^[1]。本研究中,将经酶切鉴定正确的克隆质粒,亚克隆到高效表达载体 pET-32 α ,经酶切鉴定正确的克隆命名为 pET-GP3。此结果的获得,为高效表达载体进一步在 *E. coli* BL21 细胞中表达 PRRSV 的 GP3 蛋白,研究其免疫特性、结构与功能奠定基础。

参考文献:

[1] Wensvoort G, Terpstra C, Pol J M A, *et al.* Mystery swine disease in the Netherlands; the isolation of Lelystad virus [J]. *Vet Q*, 1991, 13: 121-130.

[2] Mengeling W L, Lager K M, Vorwald A C. Clinical effects of porcine reproductive and respiratory syndrome virus on pigs during the early postnatal interval [J]. *Am J Vet Res*, 1998, 59 (1): 52-55.

[3] 乔传玲, 郑厚旌, 甘孟侯, 等. 反转录 2 聚合酶反应检测猪繁

殖与呼吸综合征病毒的研究[J]. *畜牧兽医学报*, 2000, 31 (3): 262-266.

[4] 杨汉春, 管山红, 尹晓敏, 等. 猪繁殖与呼吸综合征病毒的分离与鉴定[J]. *中国兽医杂志*, 1997, 23 (11): 325.

[5] Wiczorek-Krohmer M, Weiland F, Conzelmann K, *et al.* Porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV); monoclonal antibodies detect common epitopes on two viral proteins of European and U. S. isolates[J]. *Vet Microbiol*, 1996, 51(3-4): 257-266.

[6] Van Nieuwstadt A P, Meulenberg J J M, Van Essen-Zandbergen A, *et al.* Proteins encoded by open reading frames 3 and 4 of the genome of Lelystad virus (Arteriviridae) are structural proteins of the virion[J]. *J Virol*, 1996, 70: 4 767-4 772.

[7] Plana Duran J, Climent I, Sarraseca J, *et al.* Baculovirus expression of proteins of porcine reproductive and respiratory syndrome virus strain Olotl 91 Involvement of *ORF3* and *ORF5* proteins in protection[J]. *Virus Genes*, 1997, 14: 19-29.



常见废弃量名称与标准量名称对照表

废弃量名称	标准量名称
比重	体积质量, [质量]密度, 相对体积质量, 相对密度
绝对温度, 开氏温度	热力学温度
比热	质量热容, 比热容
电流强度	电流
电量	电荷[量]
分子量	相对分子质量, 分子质量
重量百分数, 重量百分浓度	质量分数
体积百分数, 体积百分浓度	体积分数
摩尔浓度, 当量浓度	物质的量浓度, 浓度
粒子剂量	粒子注量
放射性强度, 放射性	[放射性]活度