

猪繁殖与呼吸综合征病毒 ORF5/6/7 基因真核载体的构建

康艳梅, 赵明秋, 沈海燕, 琚春梅, 陈金顶
(华南农业大学 兽医学院, 广东 广州 510642)

摘要:针对 PRRSV ORF5 ~ ORF7 设计 3 对特异性引物,以 PRRSV GD-XH 株和 GD08-1 株为模板进行 RT-PCR 扩增,并将扩增产物克隆到真核表达载体 pEGFP-N1 中,获得重组质粒 pEGFP-N1-(ORF5 ~ ORF7),然后将重组表达质粒转染 Marc-145 细胞.通过荧光显微镜观察显示,重组质粒 pEGFP-N1-(ORF5 ~ ORF7)和载体 pEGFP-N1 均有绿色荧光出现.结果表明:成功构建了表达 PRRSV GD-XH 株和 PRRSV GD08-1 株的 GP5、M、N 蛋白的真核表达质粒 pEGFP-N1-GD-XH-GP、pEGFP-N1-GD-XH-M、pEGFP-N1-GD-XH-N、pEGFP-N1-GD08-1-GP5、pEGFP-N1-GD08-1-M、pEGFP-N1-GD08-1-N.

关键词:猪繁殖与呼吸综合征病毒; ORF5/6/7; pEGFP-N1
中图分类号:S852.65 **文献标志码:**A **文章编号:**1001-411X(2012)02-0256-03

Construction of Eukaryotic Expressing Vector from ORF5/6/7 of Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus

KANG Yan-mei, ZHAO Ming-qiu, SHEN Hai-yan, JU Chun-mei, CHEN Jin-ding
(College of Veterinary Medicine, South China Agricultural University, Guangzhou 510642, China)

Abstract: Specific primers aiming to ORF5-ORF7 of porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRSV) were designed. The target segments with restricted enzyme digestive sites were obtained by RT-PCR with PRRSV GD-XH and GD08-1 as template. All the segments were inserted into vector pEGFP-N1 to obtain six recombinant plasmids:pEGFP-N1-GD-XH-GP5, pEGFP-N1-GD-XH-M, pEGFP-N1-GD-XH-N, pEGFP-N1-GD08-1-GP5, pEGFP-N1-GD08-1-M, pEGFP-N1-GD08-1-N. The recombinant plasmid was transfected into Marc-145 cell. Fluorescence microscopy showed that EGFP were expressed in all transfected cells.

Key words:porcine reproductive and respiratory syndrome virus; ORF5/6/7; pEGFP-N1

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)引起的猪的一种高度传染性疾病.2006 年我国爆发了一场 PRRS 疾病,这次大流行遍布 10 多个省市,给养猪业带来毁灭性的打击,导致严重的经济损失^[1]. PRRSV 基因组长度约为 15 kb,

是不分节段、有囊膜的单股正链 RNA 病毒,含有 9 个开放阅读框(ORFs)^[2-3]. 病毒基因组的各个读码框之间有部分重叠,其中,GP5 基因编码的糖基化的囊膜蛋白(GP5 蛋白)具有诱导细胞凋亡^[4],参与病毒粒子结合病毒受体的过程等作用. ORF6 编码的膜基质蛋白又称 M 蛋白,它是北美毒株结构蛋白中高度保守的蛋白,具有很强的免疫原性;ORF7 编码核

收稿日期:2011-04-22
作者简介:康艳梅(1983—),女,硕士;通信作者:陈金顶(1964—),男,教授,博士; E-mail:jdchen@scau.edu.cn
基金项目:广东省科技计划项目(2007A020300064);广东省自然科学基金创新团队项目(5200638);教育部“长江学者和创新团队发展计划”创新团队项目(TRT0723)

衣壳蛋白又称 N 蛋白,保守性较好,在病毒粒子中含量较高,免疫原性极强^[5-7]. 本研究构建了 GP5、M、N 蛋白的真核表达载体,并初步鉴定了表达情况,为以后 GP5、M、N 蛋白对 NF-κB 信号通路的激活研究奠定基础.

1 材料与方法

1.1 材料

Marc-145 细胞及病毒 GD-XH、GD08-1、感受态细胞 *Escherichia coli* DH-5α、pMD18-T、pEGFP-N1 载体由华南农业大学兽医学院兽医微生物与免疫学教研室保存; RNA 酶抑制剂、Ex Taq DNA 聚合酶、dNTPs (dATP、dCTP、dGTP、dTTP 各 2.5 mmol/L)、T4 DNA 连接酶、限制性内切酶 *Eco*RI、*Xho*I 为 TaKaRa 生物工程公司产品; 反转录酶 SS III (SuperScriptTM Reverse Transcriptase)、Pfu 酶、脂质体 LipofectaminTM 2000 为 Invitrogen 公司产品; DEPC、饱和酚、溴化乙锭 (EB)、琼脂糖等为上海生物工程技术有限公司产品; DNA 回收试剂盒、质粒抽提试剂盒、去内毒素质粒抽提试剂盒为 Omega 公司产品.

1.2 引物设计与 PCR 扩增

参照 GenBank 中已发表的 PRRSV 的基因序列, 用 Primer 5.0 软件设计 3 对用于扩增 PRRSV 的 GP5、M、N 基因并带有 *Eco*R I 和 *Xho* I 酶切位点(引物中斜体部分)的引物: GP5-F/GP5-R、M-F/M-R、N-F/N-R(表 1), 并由上海生工生物工程有限公司合成.

表 1 PRRSV ORF5 ~ ORF7 基因的扩增引物		
Tab. 1 Primers for ORF5 – ORF7 amplification of PRRSV		
引物名称	引物序列	扩增长度/bp
GP5-F	5'-AATCTCGAGATGTTGGGGAAGTGCTTG-3'	603 + 18
GP5-R	5'-ACTGAATTCCTAGACGACCCCATTG-3'	
M-F	5'-AATCTCGAGATGGGGTCGTCTCTAG-3'	525 + 18
M-R	5'-CCGGAATTCTTATTGGCATATTTAAC-3'	
N-F	5'-GGCCTCGAGATGCCAAATAACAACG-3'	327 + 18
N-R	5'-ATTGAATTCTCATGCTGAGGGTG-3'	

扩增条件为 95 ℃ 3 min 预变性; 然后 95 ℃ 30 s, 58 ℃/53 ℃ 50 s, 72 ℃ 30 s, 30 个循环; 最后 72 ℃ 延伸 10 min. 取 5 μL PCR 产物用 0.01 g/L 琼脂糖凝胶(含 0.5 μg/μL EB)电泳检测.

1.3 真核表达载体的构建

将 PCR 产物回收纯化后分别克隆入 pMD18-T 载体, 选取阳性重组质粒, 送上海博尚生物技术公司进行序列测定. 对测序正确的阳性质粒及质粒

pEGFP-N1 用限制性内切酶, *Xho* I 和 *Bam* H I 分别双酶切并回收. 将回收的产物连接, 转化新鲜的 *E. coli* DH5α 感受态细胞, 提取质粒并进行双酶切鉴定. 将经鉴定的阳性质粒送上海博尚生物技术公司测序; 测序正确的重组质粒命名为 pEGFP-N1-GD-XH-ORF5、pEGFP-N1-GD-XH-ORF6、pEGFP-N1-GD-XH-ORF7、pEGFP-N1-GD08-1-ORF5、pEGFP-N1-GD08-1-ORF6 和 pEGFP-N1-GD08-1-ORF7.

1.4 细胞转染

对 Marc-145 细胞采用试剂 LipofectaminTM 2000 转染重组质粒 pEGFP-N1-(ORF5 ~ ORF7). LipofectaminTM2000 转染的步骤、转染试剂的预处理以及 DNA 和试剂的用量按照转染试剂盒说明书进行转染.

1.5 荧光检测

转染重组质粒 pEGFP-N1-(ORF5 ~ ORF7) 后 24 和 48 h, 分别在荧光显微镜下观察 Marc-145 细胞, 观察报告基因 EGFP 的表达情况.

2 结果与分析

2.1 目的基因片段的扩增

用设计的 ORF5 ~ ORF7 基因特异性引物, 以 PRRSV GD-XH 株和 GD08-1 株 cDNA 为模板进行 PCR 扩增, 扩增产物经琼脂糖凝胶电泳可见 ORF5 的扩增大小为 620 bp 左右, ORF6 的扩增大小为 540 bp 左右, ORF 7 的扩增大小为 340 bp 左右, 与预期大小相符(图 1).

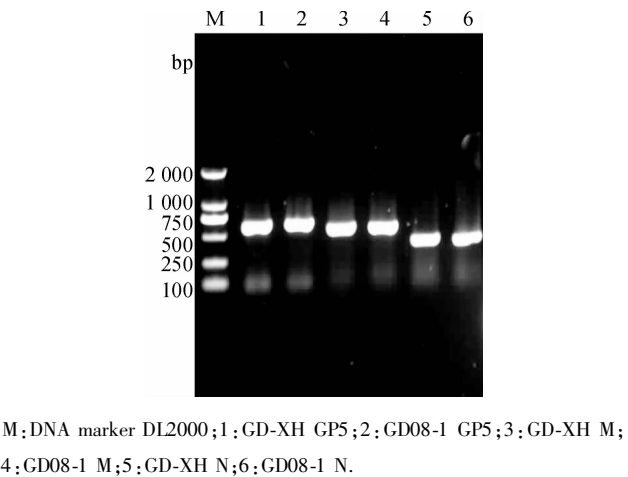


图 1 PRRSV GD-XH/GD08-1 的 GP5/M/N 蛋白 RT-PCR 扩增结果

Fig. 1 Agarose gel electrophoresis of RT-PCR product

2.2 重组质粒 pEGFP-N1-(ORF5 ~ ORF7) 的酶切鉴定

用 *Xho* I 和 *Bam* H I 双酶切重组质粒 pEGFP-

N1-(ORF5 ~ ORF7), 分别出现 4 700 (载体) 和 620 bp、540 和 340 bp 的外源片段 (ORF5 ~ ORF7) 2 条带 (图 2) 再将经鉴定的阳性质粒送上海博尚生物技术公司测序; 测序结果表明 ORF5 ~ ORF7 蛋白基因已经正确插入到真核表达载体 pEGFP-N1 内, 从而构建成重组真核表达质粒并分别命名为 pEGFP-N1-GD-XH-ORF5、pEGFP-N1-GD-XH-ORF6、pEGFP-N1-GD-XH-ORF7、pEGFP-N1-GD 08-1-ORF5、pEGFP-N1-GD08-1-ORF6 和 pEGFP-N1-GD08-1-ORF7.

2.3 表达产物的荧光显微镜观察

Marc-145 细胞分别转染重组质粒 pEGFP-N1-(ORF5 ~ ORF7) 后 24 和 48 h, 在荧光显微镜下观察转染的细胞. 经观察发现, 重组质粒 pEGFP-N1-(ORF5 ~ ORF7) 和载体 pEGFP-N1 均有绿色荧光出现 (图 3).

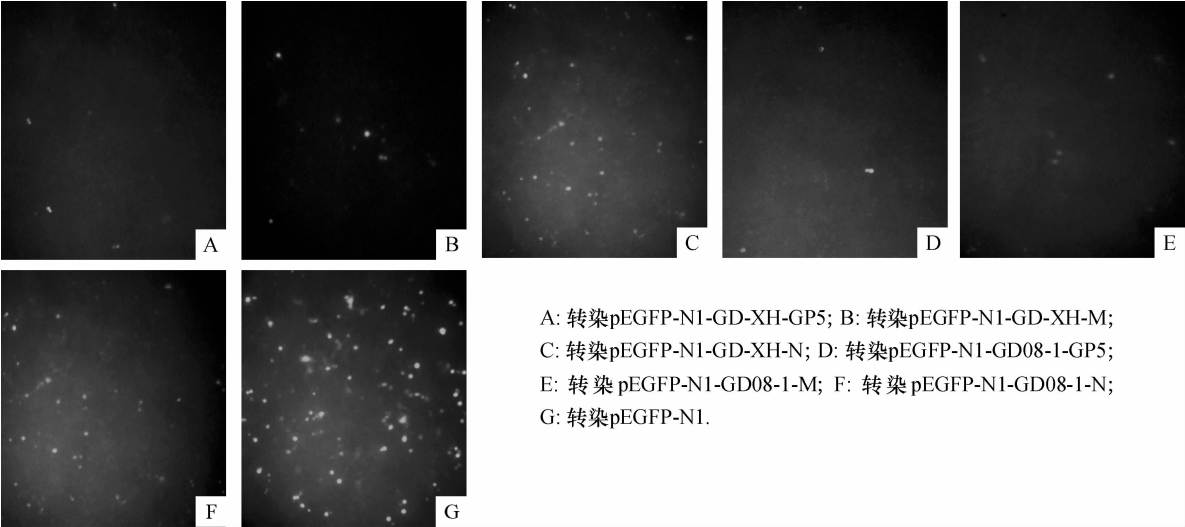
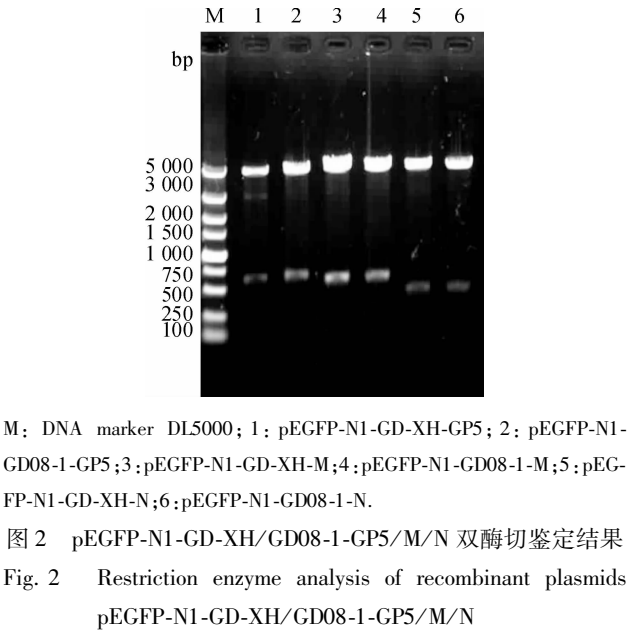


图 3 转染重组质粒 48 h 后荧光显微镜观察图
Fig. 3 Fluorescence microscopy observation of reporter gene expression in transfected cells

3 讨论与结论

通过 PCR、*Xho*I 和 *Bam* HI 双酶切和序列测定验证, 本试验成功地将经典毒株 PRRSV GD-XH 和高致病性毒株 PRRSV GD08-1 的 GP5、M、N 蛋白分别插入到真核表达载体 pEGFP-N1 中, 为进一步研究经典毒株与高致病性毒株 GP5、M、N 蛋白结构的差异, 经典毒株与高致病性毒株 GP5、M、N 蛋白对 NF- κ B 信号通路的影响及其他的生物学功能的异同奠定了基础.

体外研究基因表达, 细胞转染是关键技术之一. 要取得转染成功, 必须对影响转染的各因素很好调控, 影响脂质体介导的转染效率因素包括: 脂质体和 DNA 的浓度; 细胞生长状况和细胞密度; DNA 纯度; 血清的影响; 双抗的影响; 细胞对于脂质体-DNA 复



M: DNA marker DL5000; 1: pEGFP-N1-GD-XH-GP5; 2: pEGFP-N1-GD08-1-GP5; 3: pEGFP-N1-GD-XH-M; 4: pEGFP-N1-GD08-1-M; 5: pEGFP-N1-GD-XH-N; 6: pEGFP-N1-GD08-1-N.
图 2 pEGFP-N1-GD-XH/GD08-1-GP5/M/N 双酶切鉴定结果
Fig. 2 Restriction enzyme analysis of recombinant plasmids pEGFP-N1-GD-XH/GD08-1-GP5/M/N

合物的暴露时间^[8-9]. 本试验选用了 Omega 公司去内毒素质粒抽提试剂盒进行质粒抽提, 保证了质粒 DNA 无内毒素, 且使用分光光度计测定 DNA 的浓度及纯度, 保证其 $D_{260\text{ nm}}/D_{280\text{ nm}}$ 比值应达到 1.8 以上. 本试验对于脂质体和 DNA 的浓度进行了筛选, 得出其浓度比为 3:1 时最佳, 且对于 6 孔板的 1 个孔, 最适宜的 DNA 转染量为 4 μ g.
此外, 不同细胞的转染效率也有所不同. 为了使试验更接近于 PRRSV 感染猪时各蛋白表达的实际情况, 本试验采用了 PRRSV 敏感的 Marc-145 细胞. 试验采用低代次的 Marc-145 细胞, 且在细胞生长旺盛的状态下进行转染, 但转染效率依然比较低. 如何提高 Marc-145 细胞的转染效率有待进一步研究.
(下转第 263 页)

- in *Enterobacteriaceae* in Turkey[J]. Antimicrobial Agents Chemotherapy, 2005, 49(5): 2146-2147.
- [12] YUE Lei, JIANG Hong-xia, LIAO Xiao-ping, et al. Prevalence of plasmid-mediated quinolone resistance *qnr* genes in poultry and swine clinical isolates of *Escherichia coli* [J]. Veterinary Microbiology, 2008, 132(3/4): 414-420.
- [13] MA Jun-ying, ZENG Zhen-ling, CHEN Zhang-liu, et al. High prevalence of plasmid-mediated quinolone resistance determinants *qnr*, *aac(6')-Ib-cr*, and *qepA* among ceftiofur-resistant *Enterobacteriaceae* isolates from companion and food-producing animals[J]. Antimicrobial Agents Chemotherapy, 2009, 53(2): 519-524.
- [14] HUANG Si-yang, DAI Lei, XIA Li-ning, et al. Increased prevalence of plasmid-mediated quinolone resistance determinants in chicken *Escherichia coli* isolates from 2001 to 2007 [J]. Foodborne Pathogens and Disease, 2009, 6(10): 1203-1209.
- [15] Clinical, Laboratory Standards Institute. Performance standards for antimicrobial disk susceptibility tests for bacteria isolated from animals: Approved standard [M]. 3rd ed. Wayne, PA: Clinical, Laboratory Standards Institute, 2008.
- [16] MARTÍNEZ-MARTÍNEZ L, PASCUAL A, JACOBY G A. Quinolone resistance from a transferable plasmid[J]. Lancet, 1998, 351(9105): 797-799.
- [17] POIREL L, VILLA L, BERTINI A, et al. Expanded-spectrum β -actamase and plasmid-mediated quinolone resistance[J]. Emerg Infect Dis, 2007, 13(5): 803-805.
- [18] POIREL L, LEVIANDIER C, NORDMANN P. Prevalence and genetic analysis of plasmid-mediated quinolone resistance determinants *QnrA* and *QnrS* in *Enterobacteriaceae* isolates from a French university hospital[J]. Antimicrobial Agents Chemotherapy, 2006, 50(12): 3992-3997.
- [19] CHEUNG T K, CHU Y W, CHU M Y, et al. Plasmid-mediated resistance to ciprofloxacin and cefotaxime in clinical isolates of *Salmonella enterica* serotype Enteritidis in Hong Kong[J]. Journal Antimicrobial Chemotherapy, 2005, 56(3): 586-589.
- [20] CHU Y W, CHEUNG T K, NG T K, et al. Quinolone resistance determinant *qnrA3* in clinical isolates of *Salmonella* in 2000 - 2005 in Hong Kong[J]. Journal Antimicrobial Chemotherapy, 2006, 58(4): 904-905.
- [21] CAMBAU E, LASCOLS C, SOUGAKOFF W, et al. Occurrence of *qnrA*-positive clinical isolates in French teaching hospitals during 2002-2005[J]. Clin Microbiol Infect, 2006, 12(10): 1013-1020.
- [22] BASS L, LIEBERT C A, LEE M, et al. Incidence and characterization of integrons, genetic elements mediating multiple-drug resistance, in avian *Escherichia coli* [J]. Antimicrobial Agents Chemotherapy, 1999, 43(12): 2925-2929.
- [23] CORKILL J, ANSON J, HART C. High prevalence of the plasmid-mediated quinolone resistance determinant *qnrA* in multidrug-resistant *Enterobacteriaceae* from blood cultures in Liverpool, UK [J]. Journal of Antimicrobial Chemotherapy, 2005, 56(6): 1115-1117.
- [24] SALYERS A A, GUPTA A, WANG Y. Human intestinal bacteria as reservoirs for antibiotic resistance genes [J]. Trends in Microbiology, 2004, 12(9): 412-416.
- [25] SALYERS A, SHOEMAKER N B. Reservoirs of antibiotic resistance genes[J]. Animal Biotechnology, 2006, 17(2): 137-146.

【责任编辑 李晓卉】

(上接第258页)

参考文献:

- [1] TIAN Ke-gong, YU Xiu-ling, ZHAO Tie-zhu, et al. Emergence of fatal PRRSV variants; Unparalleled outbreaks of atypical PRRS in China and molecular dissection of the unique hallmark[J]. PloS ONE, 2007, 2(6): 526-535.
- [2] WENSVOORT G, DE KLUYVER E P, LUIJTZE E A, et al. Antigenic comparison of Lelystad virus and swine infertility and respiratory syndrome virus[J]. J Vet Diagn Invest, 1992, 4(2): 134-138.
- [3] GAO Zhi-qiang, GUO Xin, YANG Han-chun, et al. Genomic characterization of two Chinese isolates of Porcine respiratory and reproductive syndrome virus[J]. Arch Virol, 2004, 149(7): 1341-1351.
- [4] PIRZADEH B, DEA S. Immune response in pigs vaccinated with plasmid DNA encoding ORF5 of porcine reproductive and respiratory[J]. J Gen Virol, 1998, 79(5): 989-999.
- [5] NELSEN C J, MURTAUGH M P, FAABERG K S. Porcine reproductive and respiratory syndrome virus comparison: Divergent evolution on two continents[J]. Virol, 1999, 73(1): 270-280.
- [6] LI Hua, YANG Han-chun. Infection of porcine reproductive and respiratory syndrome virus suppresses the antibody response to classical swine fever virus vaccination[J]. Vet Microbiol, 2003, 95(4): 295-301.
- [7] KWON B, ANSARI I H, OSORIO F A, et al. Infectious clone-derived viruses from virulent and vaccine strains of porcine reproductive and respiratory syndrome virus mimic biological properties of their parental viruses in a pregnant sow model[J]. Vaccine, 2006, 24(49-50): 7071-7080.
- [8] 吴海涛, 胡云龙, 陈松, 等. 重组蛋白在中国仓鼠卵巢细胞中高效表达的影响因素[J]. 中国生物工程杂志, 2004(8): 1-5.
- [9] 徐艳, 李鹏, 张蕴惠, 等. 重组质粒 pcDNA3/sil-IR(I) 在哺乳动物细胞中的表达[J]. 华西口腔医学杂志, 2003(12): 467-470.

【责任编辑 柴焰】