

对不同表达系统的猪圆环病毒2型 Rep 蛋白的电泳特性分析

张婷婷, 程晓亮, 林文耀, 陈筱薇, 张桂红, 廖明, 樊惠英

(农业部动物疫病防控重点实验室, 华南农业大学 兽医学院, 广东 广州 510642)

摘要:利用特异性引物从圆环病毒2型(PCV2)毒株克隆出 Rep 基因,并将其插入到原核表达载体 pET28a 和杆状病毒转移载体 pFastbacHT(B)上,利用大肠杆菌 BL21(DE3)株原核系统以及 Bac-to-Bac 杆状病毒系统表达 Rep 蛋白. Western-blotting 表明,原核和真核表达系统均能表达出圆环病毒2型 Rep 蛋白,电泳分析表明,不同系统表达得到的 Rep 蛋白有不同的电泳特性,揭示 Rep 蛋白存在翻译后修饰.

关键词:圆环病毒2型; Rep 蛋白; 原核表达; 真核表达; 杆状病毒表达系统

中图分类号:S852.65

文献标识码:A

文章编号:1001-411X(2010)04-0118-03

Electrophoretic Characterization of PCV2 Rep Proteins Expressed by Different Expression Systems

ZHANG Ting-ting, CHENG Xiao-liang, LIN Wen-yao,

CHEN Xiao-wei, ZHANG Gui-hong, LIAO Ming, FAN Hui-ying

(Key Laboratory for Prevention and Control of Animal Diseases of the Ministry of

Agriculture, College of Veterinary Medicine, South China Agricultural University, Guangzhou 510642, China)

Abstract: Rep gene of PCV type 2 was amplified, and further inserted into the prokaryotic expression vector (pET28a) and the eukaryotic transfer vector (pFastbacHT(B)). Rep protein was expressed by both *Escherichia coli* BL21(DE3) and by baculovirus infected Sf9 cell line. Western-blotting indicated that prokaryotic and eukaryotic Rep proteins were successfully expressed with different electrophoretic characteristics, which revealed that there may be post-translational effects on Rep protein.

Key words: porcine circovirus type 2; Rep protein; prokaryotic expression; eukaryotic expression; baculovirus expression system

圆环病毒(Porcine circovirus, PCV)属圆环病毒科,圆环病毒属,基因组为单股环状 DNA,为 2 000 bp. 分为 2 型,即圆环病毒 1 型(PCV1)^[1]和圆环病毒 2 型(PCV2)^[2]. PCV1 是机体和细胞的常在病毒,不具备致病性,而 PCV2 则是多系统衰竭综合症(PMWS)的病原. PCV2 有 2 个蛋白,分别是 Cap 蛋

白和 Rep 蛋白, Cap 蛋白是病毒的结构蛋白,具有良好的抗原性,而 Rep 蛋白是非结构蛋白,在所有的圆环病毒里高度保守,参与病毒复制,对圆环病毒繁殖起重要作用. Rep 基因翻译成 2 个蛋白,一个是 Rep 基因全长阅读框的 312 个氨基酸的蛋白,即 Rep 蛋白,相对分子质量为 35 700. 另一个是 168 个氨基酸

收稿日期:2009-11-03

作者简介:张婷婷(1982—),女,硕士研究生;通信作者:廖明(1968—),男,教授,博士, E-mail: mliao@scau.edu.cn; 樊惠英(1977—),女,讲师,博士, E-mail: fanhy@scau.edu.cn

基金项目:“863”计划(2006AA10A205);教育部新世纪优秀人才支持计划(NCET-06-0752);国家自然科学基金青年基金(30800826);广东省博士启动基金(8451064201001131);农业微生物学重点实验室开发课题(20090010);华南农业大学校长基金(5500-K08240)

的 Rep' 蛋白^[3]. 研究表明 2 种蛋白都能结合病毒 DNA, 对启动病毒 DNA 复制是必要的, 对 2 种蛋白定位试验表明, 他们都定位于细胞核^[4]. 目前发现 3 种参与病毒周期的细胞蛋白与 Rep 蛋白作用^[5], 研究也表明, PCV2 的 Rep 蛋白结合到 Cap 蛋白和中间纤毛样蛋白上^[6]. 本研究目的主要是利用原核和真核系统表达出 PCV2 的 Rep 蛋白, 为进一步研究 Rep 蛋白的功能作准备.

1 材料与方 法

1.1 材 料

本试验相关的 PCV2 毒株、细胞、菌种和质粒均由华南农业大学兽医学院传染病教研室保存.

1.2 方 法

1.2.1 原核表达质粒的构建以及 Rep 蛋白的原核表达与纯化 根据 PCV2 GD 株序列设计合成 1 对扩增 ORF1 基因的引物, RepF: 5'-ATCGATggatccATGCCAGCAAGAAGAAT-3' 和 RepR: 5'-ATCGATctcgagT-CAGTAATTTATTTTCATA-3', 其 5' 端分别引入限制性内切酶 *Bam*H I 和 *Xho* I. 构建重组表达质粒 pET-28a-Rep, 并将其转化 BL21 (DE3) 菌, IPTG 诱导表达, 最后用 GE 蛋白纯化柱, 按操作说明书纯化 Rep 蛋白.

1.2.2 杆状病毒转移载体、重组穿梭载体的构建 参照 Bac-to-Bac 表达系统手册, 将用 *Bam*HI 和 *Xho*I 双酶切后的 ORF1 基因, 与转移载体 pFastBacHT (B) (Invitrogen) 连接, 构建 pFastBacHT-Rep. 并将其转化 DH10Bac 大肠杆菌, 通过蓝白斑筛选、纯化阳性菌落. 将阳性菌落接种于高盐 LB 液体培养基中进行扩增, 提取重组穿梭载体 Bacmid-Rep.

1.2.3 重组杆状病毒 Ac-Rep 的获得 参照文献 [7-8], 提取纯化 Bacmid-Rep, 利用 Cellfectin 转染 Sf9 细胞, 于 28 °C 培养, 待出现细胞病变, 收集上清液即获得重组杆状病毒 Ac-Rep.

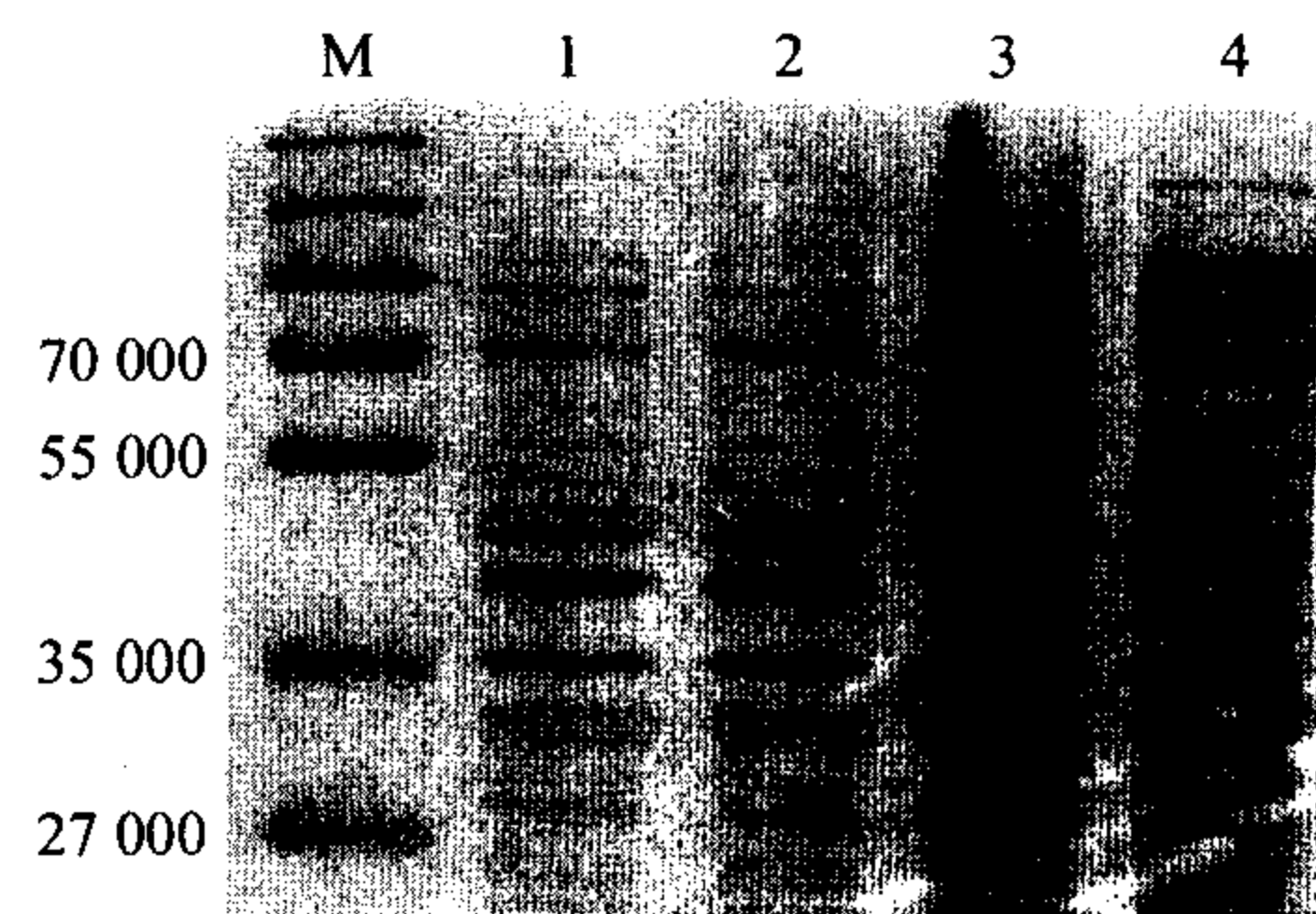
1.2.4 Rep 蛋白的 Western-blotting 分析 收集 Ac-Rep 感染 72 h 后的细胞以及原核表达的 Rep 蛋白, 经 12% SDS-PAGE 电泳并转印 NC 膜, 以抗 PCV2 的阳性血清为一抗, HRP 标记羊抗猪 IgG 为二抗进行 Western-blotting 分析.

2 结 果

2.1 原核表达 Rep 蛋白的表达

经测序结果证实所构建的 pET-28a-Rep 正确无误, 将其转化至 BL21 (DE3), 将诱导 4 h 后的产物进行 SDS-PAGE, 结果如图 1 所示: 与含 pET-28a 空载

体的表达菌 (泳道 3-4) 相比, 含 pET-28a-Rep 的表达菌 (泳道 1-2) 经诱导后产生了相对分子质量约 40 000 的条带.



M: 蛋白质相对分子质量标准; 1、2: 含重组质粒 pET-28a-Rep 的表达菌诱导 4 h 后的样品; 3、4: 含 pET-28a 空载体的表达菌诱导 4 h 后的样品.

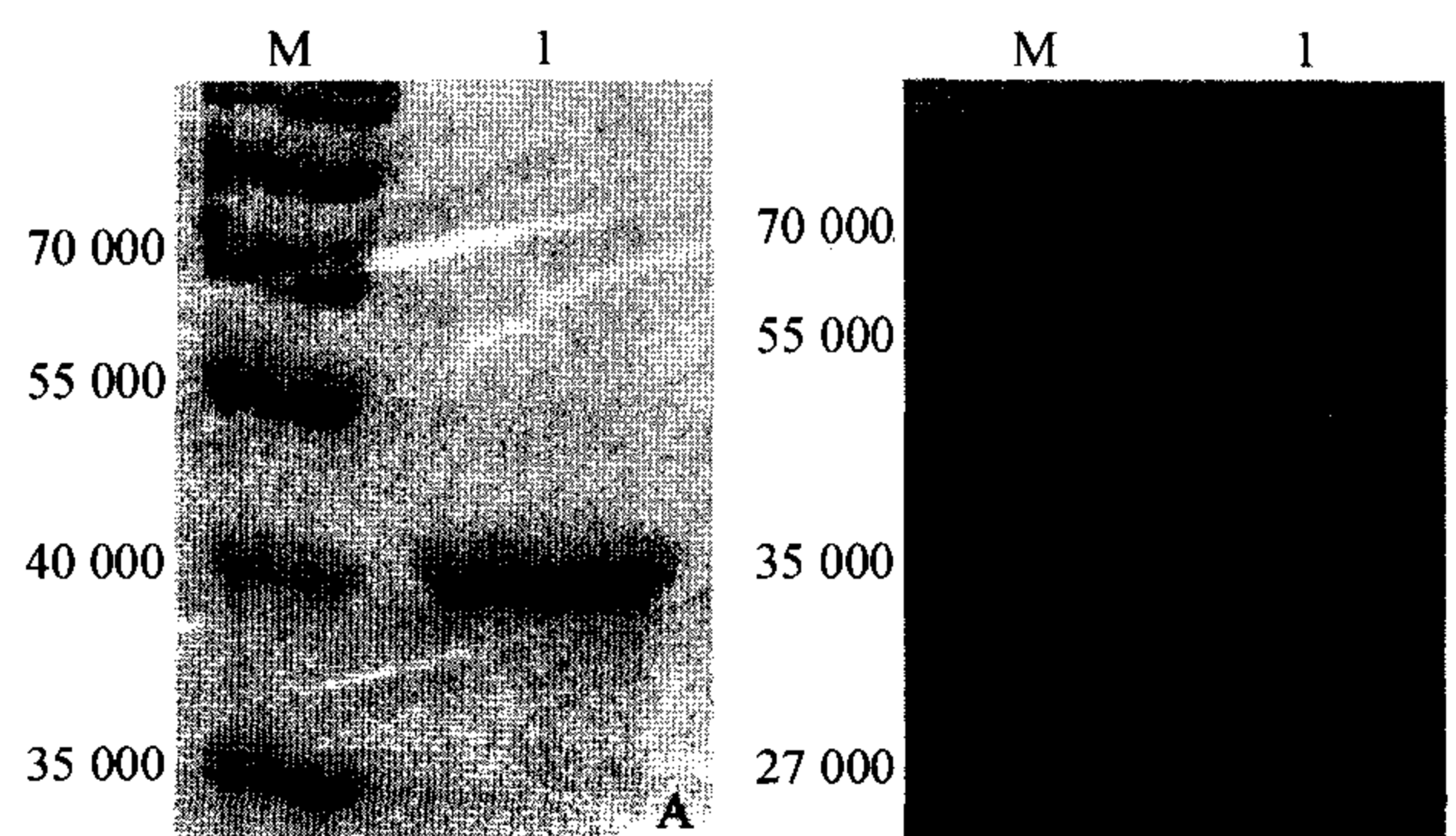
图 1 原核表达 Rep 蛋白的 SDS-PAGE

Fig. 1 SDS-PAGE of Rep proteins expressed in the *Escherichia coli*

2.2 原核表达 Rep 蛋白的纯化和 Western-blotting 分析

对 Rep 蛋白进行纯化, 用 SDS-PAGE 进行分析, 结果如图 2A 所示.

将表达后的 Rep 蛋白, 经 12% SDS-PAGE 电泳并转印 NC 膜, 以抗 PCV2 的阳性血清为一抗, HRP 标记的羊抗猪 IgG 为二抗进行 Western-blotting, 结果表明 Rep 蛋白具有较好的抗原性, 能与 PCV2 阳性血清发生反应, Rep 蛋白的相对分子质量约为 40 000, 结果如图 2B 所示.



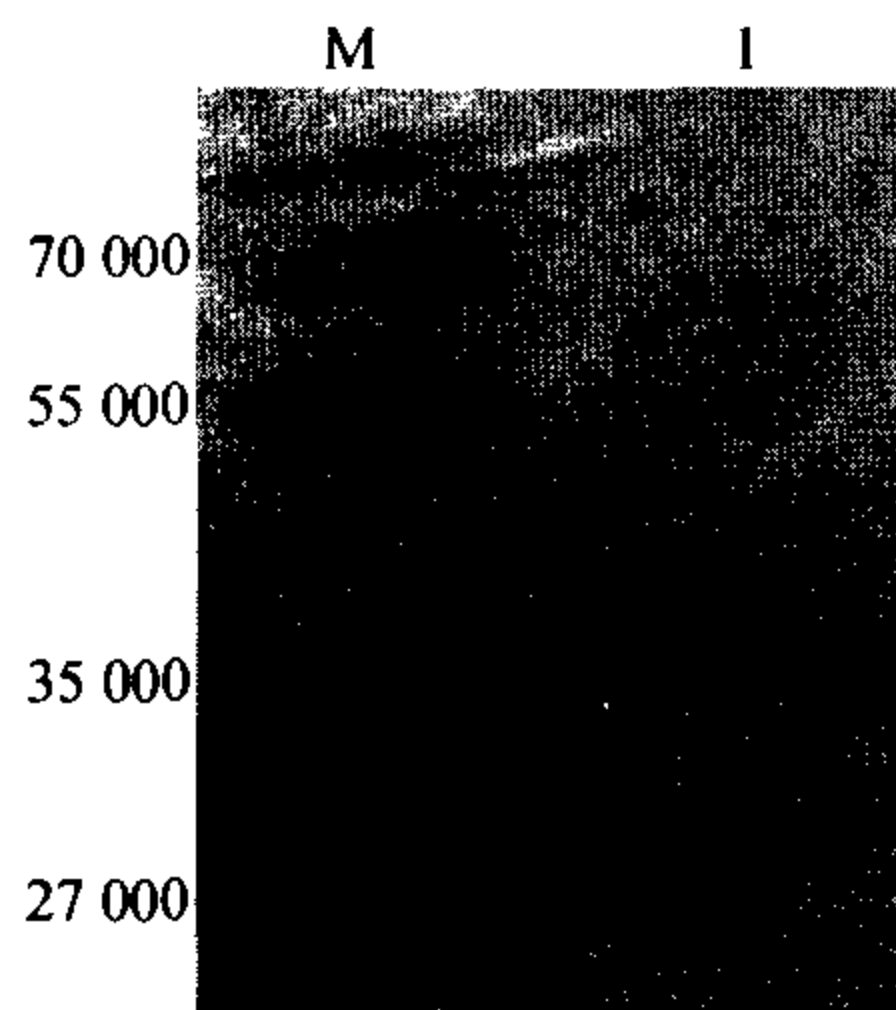
M: 蛋白质相对分子质量标准; 1: Rep 蛋白.

图 2 原核表达 Rep 蛋白纯化后的 SDS-PAGE (A) 与 Western-blotting 分析 (B)

Fig. 2 SDS-PAGE (A) and Western-blotting (B) analysis of Rep protein after purification

2.3 Rep 蛋白的真核表达及 Western-blotting 分析

收集 Ac-Rep 感染 72 h 后的细胞, 进行 Western-blotting 分析, 结果表明在 Ac-Rep 感染的产物中出现约 36 000 的条带 (图 3).



M:蛋白质相对分子质量标准;I:真核表达的 Rep 蛋白.

图3 真核表达 Rep 蛋白的 Western-blotting 分析

Fig. 3 Western-blotting analysis of Rep protein expressed in Eukaryotic system

3 讨论

Bratanich 等^[9]在 PK-15 上对 PCV2 病毒进行转录分析初步发现 ORF1 编码的 Rep 蛋白的 mRNA 能切割成 3 种 Rep 相关 mRNA, 其中 2 个转录体与 PCV1 病毒的对转录体具有很高相似性, 而另一个转录体则是 PCV2 病毒特有. Cheung 等^[10]研究人员在 PK-15 上也对 PCV2 病毒进行了转录分析, 进一步发现 ORF1 编码的 Rep 蛋白的 mRNA 能切割成 5 种 Rep 蛋白相关 mRNA, 并命名为 Rep、Rep'、Rep3a、Rep3b 和 Rep3c. 这些研究均表明 Rep 蛋白有不同的转录体, 其中某些转录体与病毒复制高度相关.

Mankertz 等^[4,11]构建不同转录体 Rep 和 Rep' 的瞬时表达质粒与以 PCV2 复制起始点为启动子表达荧光素酶 (Luc) 的瞬时表达质粒分别共转染细胞, 证明 Rep 和 Rep' 的转录体所表达的转录的蛋白均能起始 PCV1 和 PCV2 复制起始点的复制, 并且对不同的基因组的复制效率有所不同. 以上研究证明 Rep 和 Rep' 的转录体所表达的转录蛋白是参与 PCV2 基因组复制起始的蛋白.

Timmusk 等^[6]证明 PCV2 病毒的 Rep 蛋白能与 PK-15 的中间纤毛样蛋白和转录调控子 c-myc 作用, Rep 蛋白也可以与 Cap 蛋白作用. Pérez-Martín 等^[12]成功用杆状病毒系统表达出 PCV2 的 Rep 蛋白并建立以 Rep 蛋白为包被抗原的 ELISA 方法, 以应用于检测动物感染 PCV2 后产生抗 Rep 蛋白抗体的水平. Zhang 等^[13]应用原核表达系统表达出 PCV2 病毒的 Rep 蛋白并制备出单克隆抗体. Finsterbusch 等^[5]用酵母杂交试验证明 PK-15 的 ZNF265、TDG 和 VG5Q 蛋白能与 PCV2 的 Rep 蛋白作用. 以上研究揭示 Rep 蛋白与宿主细胞的作用均以 PK-15 为基础而不是 PCV2 的天然宿主细胞肺泡巨噬细胞, 同时这些研究还提示 Rep 蛋白能被原核系统和真核系统所表达, 这为在蛋白水平上研究 Rep 蛋白提供良好的工具.

本试验成功用原核和真核系统表达出 PCV2 的 Rep 蛋白, 从电泳结果来看, 原核的 Rep 蛋白与真核

的 Rep 蛋白相对分子质量不同, 可能是真核的 Rep 蛋白存在翻译后修饰, 这个结果提示 Rep 蛋白序列上存在糖基化或磷酸化等位点, 应用 2 种蛋白分别进行蛋白质水平的试验然后进行差异质谱分析可以发现新的蛋白结合位点, 应用真核的 Rep 蛋白制备单克隆抗体能得到抗 Rep 蛋白空间表位的单克隆抗体.

参考文献:

- [1] MANKERTZ A, PERSSON F, MANKERTZ J, et al. Mapping and characterization of the origin of DNA replication of porcine circovirus [J]. *J Virol*, 1997, 71(3): 2562-2566.
- [2] HAMEL A L, LIN L L, NAYAR G P. Nucleotide sequence of porcine circovirus associated with postweaning multisystemic wasting syndrome in pigs [J]. *J Virol*, 1998, 72(6): 5262-5267.
- [3] MANKERTZ A, HILLENBRAND D B. Replication of porcine circovirus type 1 requires two proteins encoded by the viral Rep gene [J]. *Virology*, 2001, 279(2): 429-438.
- [4] MANKERTZ A, CALISKAN R, HATTERMAN N K, et al. Molecular biology of porcine circovirus: analyses of gene expression and viral replication [J]. *Vet Microbiol*, 2004, 98(2): 81-88.
- [5] FINSTERBUSCH T, STEINFELDT T, DOBERSTEIN K, et al. Interaction of the replication proteins and the capsid protein of porcine circovirus type 1 and 2 with host proteins [J]. *Virology*, 2009, 386(1): 122-131.
- [6] TIMMUSK S, FOSSUM C, BERG M. Porcine circovirus type 2 replicase binds the capsid protein and an intermediate filament-like protein [J]. *J Gen Virol*, 2006, 87: 3215-3223.
- [7] 樊惠英, 陈焕春, 佟铁铸, 等. 猪圆环病毒 2 型 ORF2 基因在昆虫细胞中的表达及其特性 [J]. *生物工程学报*, 2005, 6: 975-978.
- [8] FAN H, JU C, TONG T, et al. Immunogenicity of empty capsids of porcine circovirus type 2 produced in insect cells [J]. *Vet Res Commun*, 2007, 31(4): 487-496.
- [9] BRATANICH A C, BLANCHETOT A. PCV2 replicase transcripts in infected porcine kidney (PK15) cells [J]. *Virus Genes*, 2002, 25(3): 323-328.
- [10] CHEUNG A K. Transcriptional analysis of porcine circovirus type 2 [J]. *Virology*, 2003, 305(1): 168-180.
- [11] MANKERTZ A, MUELLER B, STEINFELDT T, et al. New reporter gene-based replication assay reveals exchangeability of replication factors of porcine circovirus types 1 and 2 [J]. *J Virol*, 2003, 77(18): 9885-9893.
- [12] PÉREZ-MARTÍN E, GRAU-ROMA L, ARGILAGUET J M, et al. Development of two *Trichoplusia ni* larvae-derived ELISAs for the detection of antibodies against replicase and capsid proteins of porcine circovirus type 2 in domestic pigs [J]. *J Virol Methods*, 2008, 154(1-2): 167-174.
- [13] ZHANG X, MA G, LI Y, et al. Characterization of monoclonal antibody against replication-associated protein of porcine circovirus [J]. *DNA Cell Biol*, 2008, 142(3): 598-564.

【责任编辑 柴 焰】