

• 基础实验研究论著 •

nsp7 的原核表达、纯化与免疫原性鉴定*

刘利娅^{1#}, 李淑慧², 严峻³, 胡川闽², 余晓东^{1△}(1. 重庆师范大学生命科学学院 401331; 2. 第三军医大学医学检验系
临床生物化学教研室, 重庆 400038; 3. 重庆业为基生物科技有限公司 400039)

摘要:目的 获得高纯度和高免疫原性的猪繁殖与呼吸综合征(PRRS)病毒非结构蛋白 7(nsp7)。方法 nsp7 编码 DNA 片段是 PRRS 病毒基因组裂解产物, 酶切后连接至克隆质粒 pET-28a 构建为表达质粒 pET-28a-nsp7, 转化至大肠杆菌 BL21 中, IPTG 诱导蛋白表达, 采用 Ni²⁺-NTA 树脂纯化、Q 阴离子交换层析、镍柱浓缩 3 个连续的过程进行纯化和用 SDS-PAGE、Western blot、ELISA 法进行鉴定。在此基础上通过间接 ELISA 法对 135 份血清样品进行检测, 并与进口 LSI-ELISA 试剂盒进行比较。结果 SDS-PAGE 分析表明表达产物的相对分子质量约为 34×10^3 , 与理论值相一致; 该蛋白产量高、可溶性好, 纯度达 95%; Western blot 和间接 ELISA 法鉴定结果显示该重组蛋白能够与 PRRS 病毒的阳性血清反应, 与进口 LSI-ELISA 试剂盒相比其符合率达 91%。结论 成功构建了 nsp7 蛋白的表达与纯化系统, 获得了高纯度和高免疫原性的 nsp7 蛋白, 为 PRRS 血清学诊断奠定了基础。

关键词:猪呼吸与生殖综合征病毒; 病毒非结构蛋白类; 原核细胞; 基因表达; 酶联免疫吸附测定; 纯化

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2012.09.001

文献标识码:A

文章编号:1673-4130(2012)09-1025-03

Prokaryotic expression, purification and characterization identification of nsp7*

Liu Liya^{1#}, Li Shuhui², Yan Jun³, Hu Chuanmin², Yu Xiaodong^{1△}

(1. College of Life Science, Chongqing Normal University, Chongqing 401331, China;

2. Department of Clinical Biochemistry, Laboratory Science, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China;

3. Chongqing Novogent Biotech Co., Ltd, Chongqing 400039, China)

Abstract: Objective To obtain nonstructural protein 7(nsp7) with high purity and high immunogenicity. **Methods** DNA fragment coding nsp7, which was cleaved product of the genome of porcine reproductive and respiratory syndrome virus(PRRSV), was cloned into pET-28a vector to construct expression plasmid pET-28a-nsp7, that was then transformed into Escherichia coli(E. coli) BL21 strain. Recombinant protein of nsp7 was expressed by induction with IPTG, purified by nickel-metal chelate chromatography, Q anion exchange chromatography and nickel concentrate and identified by sodium dodecyl sulphate-polyacrylamide gel electrophoresis(SDS-PAGE), Western blotting and enzyme linked immunosorbent assay(ELISA). Indirect ELISA was used to detect the immunogenicity of nsp7 through compared with the LSI-ELISA kit. **Results** SDS-PAGE showed that the size of the nsp7 protein was 34×10^3 , being consistent with theoretical data. Recombinant protein of nsp7 was easily expressed, with good solubility and with purity 95%. Western blot and indirect ELISA indicated that nsp7 recombinant protein was able to react with serum samples positive with PRRSV, and the detected results were high correlated with those detected by LSI-ELISA. **Conclusion** An expression and purification system of nsp7 was successfully constructed, and recombinant nsp7 protein with high purity and high immunogenicity was obtained, which lay a foundation for further study of serological diagnosis of PRRS.

Key words: porcine respiratory and reproductive syndrome virus; viral nonstructural proteins; prokaryotic cells; gene expression; enzyme-linked immunosorbent assay; purification

猪繁殖与呼吸综合征(porcine reproductive and respiratory syndrome, PRRS)是危害养猪业发展的重要疫病之一, 该病是由 PRRS 病毒(porcine reproductive and respiratory syndrome virus, PRRSV)引起的。1987 年首先于美国报道了 PRRS 的发生, 并分别于 1991、1992 年分离到该病病原——欧洲型和美洲型 PRRSV^[1]。PRRS 主要引起妊娠母猪流产、早产、死胎, 同时引起幼龄仔猪出现咳嗽、呼吸困难等呼吸道症状且死亡率较高^[2], 给世界养猪业带来巨大经济损失^[3]。因此, PRRS 血清学诊断具有重要意义。

目前对该病诊断已有一些成熟方法如血清病毒中和法(SVN)^[4]、免疫过氧化物酶单层试验(IPMA)^[5]、间接荧光抗

体试验(IFA)^[6]和间接 ELISA 法^[7]等, 上述 4 种方法均为检测猪血清中抗体^[5]。ELISA 法灵敏度高, 特异性好, 可在短时间内检测大量样本而得到广泛应用^[8]。目前美国 IDEXX 公司和法国 LSI 公司研制的 PRRSV 抗体检测的 ELISA 试剂盒均采用了多种成分 PRRSV 结构蛋白(M、Gp2、Gp3、Gp4、Gp5)作为抗原, 造成其生产过程复杂。因此, 寻找一种单一蛋白作为抗原具有重要意义。

PRRSV 为有囊膜的单股正链 RNA 病毒, 基因组长约 15 kb, 含 9 个开放阅读框。其中 ORF1 编码病毒 RNA 复制酶, ORF1a、1b 编码非结构蛋白(nonstructural protein, nsp), ORF1a 编码多聚体蛋白 ppla, 预测其可在 8 个位点裂解形成 9

* 基金项目:2011 年重庆市科技攻关项目。 # 第三军医大学医学检验系临床生物化学教研室进修。 △ 通讯作者, Tel:(023) 65362773; E-mail:xdyuyu@gmail.com。

种终产物,分别命名为 nsp1 α 、nsp1 β 、nsp2~8^[9]。ORF1b 编码多聚体蛋白 pp1ab 则可裂解形成终产物 nsp9~12。Brown 等^[10]通过实验证明在这些所有的非结构蛋白中 nsp7 抗体可能是一个更好的标靶,与其他病毒抗原相比,nsp7 免疫原性较高且序列高度保守,可作为单一抗原检测 PRRSV。然而直到现在 nsp7 蛋白的纯化尚未见详细报道。由于在 ELISA 法检测中获得高纯度和高免疫原性抗原非常重要,因此,本研究旨在构建 nsp7 蛋白的表达与纯化系统,并通过对 135 份血清样品的检测,以获得高纯度和高免疫原性 nsp7 蛋白,为 PRRS 的血清学诊断奠定基础。

1 材料与方 法

1.1 材料与试剂 所用菌株 E. coli BL21(DE3)、DH5 α 为本实验室保存,pET-28a 购自 Novagen 公司,Hind III 和 NdeI 购自 Fermentas 公司,T4DNA 连接酶购自 TaKaRa 公司,DL2000 DNA Marker、DNA 胶回收试剂盒购自 Tiangen 生物科技有限公司,质粒抽提试剂盒购自 OMEGA 公司,蛋白质 marker 为中科院生物制品研究所产品,纯化所用层析柱及填料购自 Amersham 公司,nsp7 片段由上海旭冠科技发展有限公司合成,辣根过氧化酶标记(HRP)-羊抗猪 IgG 购自美国 Adgent 公司,其他试剂均为国产化学分析纯,检测血清来自重庆动物疾病预防控制中心(CDC)。

1.2 方 法

1.2.1 重组质粒的构建及 nsp7 表达 用 Hind III 及 Nde I 双酶切 PES-nsp7 及 pET-28a,将切下 nsp7 片段连入 pET-28a 构建原核表达重组质粒,转化入 BL21(DE3)按常规异丙基- β -D-硫代吡喃半乳糖苷(IPTG)诱导表达,裂解菌体后高速离心,弃上清液,沉淀用终浓度为 0.4 M PMSF 进行悬浮,且储藏于-20 $^{\circ}$ C,作为对照。同时加入终浓度 0.6 mM IPTG 诱导表达,220 r/min(离心半径 6.2 cm)离心 10 min,28 $^{\circ}$ C 培养过夜,收获菌体,15%SDS-PAGE 电泳鉴定。

1.2.2 nsp7 的纯化 大规模诱导重组菌,收集菌体,用磷酸盐缓冲液(PBS)悬浮菌体并加入溶菌酶作用,超声裂解菌体后离心,收取上清液进行纯化,按试剂盒说明书操作。层析柱用 25、50、500 mM 咪唑进行洗脱,各片段用 15%SDS-PAGE 分析。通过镍金属螯合层析含有部分杂蛋白,进一步采用 Q 阴离子交换层析。取 XK16/20 层析柱 1 根,装入约 15 mL QHP 层析填料;依次用 Q-elution Buffer 和 Q-binding Buffer 平衡层析柱至基线;将样品溶液上样,流速 6 mL/min。并收集穿透液;上样完毕后用 Q-binding Buffer 平衡层析柱至基线;柱子用含 NaCl 溶液进行线性梯度洗脱,各片段用 15%SDS-PAGE 分析。Q 洗脱样品合并后补加 NaCl,调节 pH。5%洗脱后再 100%洗脱。收集 100%洗脱组分。每个收集管各取 15 μ L 液体后进行 SDS-PAGE,用 BCA 法测定其浓度,并置-70 $^{\circ}$ C 贮存。

1.2.3 Western blot 鉴定 纯化蛋白进行 SDS-PAGE 后电转移至 PVDF 膜上用 5%脱脂奶粉封闭 3 h 后加入 PRRSV 猪抗血清(1:1 000 稀释),4 $^{\circ}$ C 孵育过夜,洗膜,加入 HRP-羊抗猪 IgG(1:24 000 稀释),室温振荡 3 h,洗膜,显影,压片。

1.2.4 ELISA 法鉴定 用碳酸盐包被液将获得的重组 nsp7 蛋白和无关蛋白 1:60 稀释包被于 96 孔酶标板,每孔 100 μ L,37 $^{\circ}$ C 1 h,弃掉封闭液后洗涤并拍干;5%羊血清封闭各孔 4 $^{\circ}$ C 过夜,用 0.1% PBST 液洗板,每孔加入待测血清 100 μ L,20 $^{\circ}$ C 温育 30 min,洗板后加入 HRP-羊抗猪 IgG 各 100 μ L,

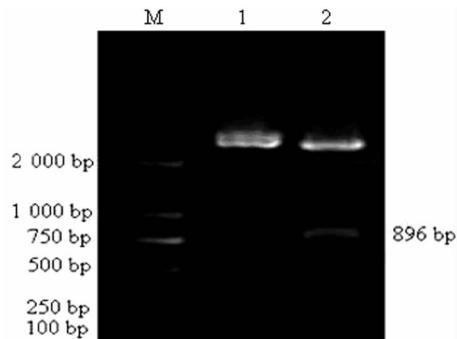
20 $^{\circ}$ C 温育 30 min 后洗板,用 TMB 显色系统显色后用酶标仪于 450 nm 处测定各孔 OD 值。

1.2.5 血清 PRRSV 测定 重庆动物 CDC 提供的 135 份血清,分别采用 nsp7-ELISA 和商业试剂盒 LSI-ELISA 进行测试,统计两种方法的符合率。

1.2.6 统计学处理 所有检测的血清样本实验采用双复孔。采用 SPSS10.0 统计软件处理数据。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

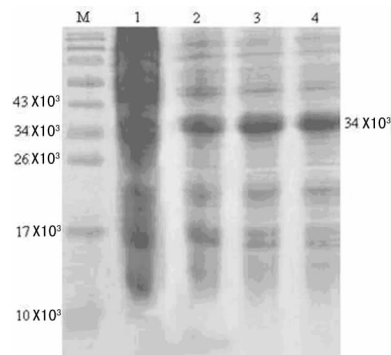
2 结 果

2.1 重组质粒的构建及 nsp7 表达 见图 1、2。



M;Marker;1:pET-28a;2:nsp7-pET-28a。

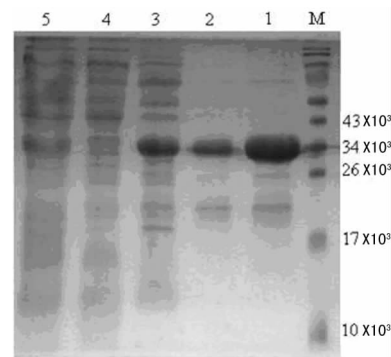
图 1 琼脂糖凝胶电泳鉴定 pET-28a/nsp7 构建情况



M;Marker;1:BL21/pET-28a/nsp7 IPTG 未诱导表达;2~4:BL21/pET-28a/nsp7 诱导表达。

图 2 SDS-PAGE 分析重组 nsp7 蛋白诱导表达

2.2 nsp7 的纯化 纯度达 95%,见图 3~5。



M;Marker;1:0.5 M 咪唑洗脱;2:50 mM 咪唑洗脱;3:25 mM 咪唑洗脱;4:穿透液;5 上清液。

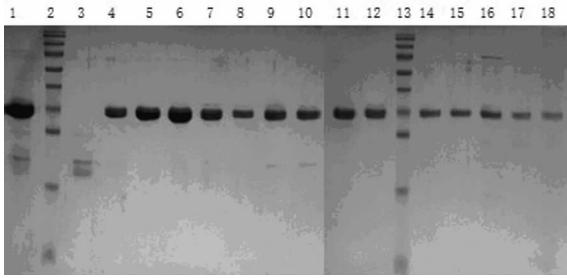
图 3 SDS-PAGE 分析镍金属螯合层析纯化 nsp7 蛋白

2.3 nsp7 的特异性

2.3.1 Western blot 鉴定 见图 6。

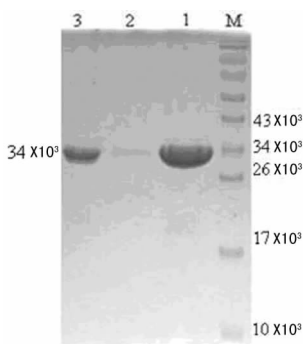
2.3.2 ELISA 法鉴定 见图 7。

2.4 临床样本检测 用获得的重组 nsp7 蛋白作为抗原检测临床样本 135 份,结果显示与商业化试剂盒符合率达 91%。



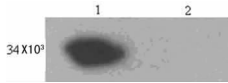
1:0.5 M、50 mM 咪唑合并;2:蛋白质标准;3:30 mM 氯化钠洗脱;4~9:80 mM 氯化钠洗脱;10:0.10 M 氯化钠洗脱;11~12:0.12 M 氯化钠洗脱;13:蛋白质标准;14:0.15 M 氯化钠洗脱;15:0.20 M 氯化钠洗脱;16~17:0.40 M 氯化钠洗脱;18:1.00 M 氯化钠洗脱。

图 4 SDS-PAGE 分析 Q 阴离子交换层析纯化 nsp7 蛋白



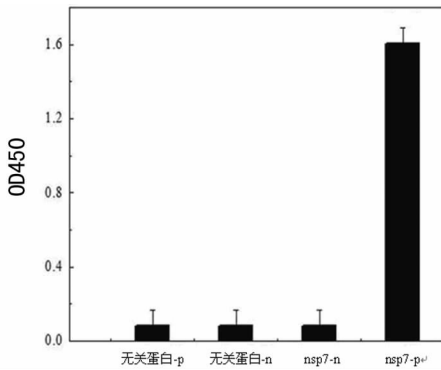
M:蛋白质标准;1:0.5 M 咪唑浓缩;2:1.00 M 氯化钠洗脱;3:80、100、120 mM 氯化钠洗脱合并,未浓缩。

图 5 SDS-PAGE 分析镍金属螯合层析浓缩 nsp7 蛋白



1:纯化的重组 nsp7 蛋白;2:无关蛋白。

图 6 Western blot 鉴定 nsp7 蛋白



p:阳性血清;n:阴性血清。

图 7 ELISA 法鉴定 nsp7 特异性

3 讨论

本研究通过基因重组技术构建了重组表达载体 pET-28a-nsp7,优化表达条件,通过酶切鉴定,证明基因合成和表达载体的构建完全正确。通过 IPTG 诱导表达在大肠杆菌中获得高产量可溶性表达,与真核表达相比,原核表达具有表达量高、条件较简单、成本低等特点,且克服了真核表达系统表达量较低、

生产过程复杂、且纯化较困难、不利于规模化生产等不利因素,既可以达到简化抗原生产的方法、提高工作效率,又利于大量生产和实际应用。

在 ELISA 法检测中抗原纯度非常重要,如何针对 nsp7 蛋白特点选择高效蛋白分离纯化方法是获取高纯度 nsp7 蛋白的关键。目前在蛋白分离纯化的过程中有多种方法如凝胶过滤层析、离子交换层析、疏水层析和亲和层析等,本研究采用以镍金属螯合层析、Q 柱、镍金属浓缩过程将重组蛋白进行纯化,经 SDS-PAGE 分析表明重组蛋白表达与纯化是成功的,并且纯度大于 95%,且 Western blot 鉴定结果显示重组蛋白具有较高免疫原性。

总之,本研究成功建立了 nsp7 原核表达和纯化系统,获得高纯度且免疫原性良好的 nsp7 蛋白。在此基础上以高纯度 nsp7 为抗原建立了间接 ELISA 法,对 135 份血清样品进行检测,并与进口 LSI-ELISA 试剂盒进行比较,其符合率达 91%。为 PRRS 大规模简便、快捷、准确和灵敏检测奠定了基础,并且给中国 PRRS 监测和普查带来极大便利,具有十分广阔的应用前景。

参考文献

- [1] Wensvoort G, Terpstra C, Pol JMA, et al. Mystery swine disease in the Netherlands; the isolation of Lelystad virus [J]. *Vet Q*, 1991, 13(3): 121-130.
- [2] Straw BE, Zimmerman JJ, D'Allaire S, et al. *Disease of swine* [M]. 9th ed. Iowa; Wiley-Blackwell, 2006: 387-417.
- [3] Holck JT, Zimmerman J, Yoon KJ. Financial Impact of PRRS. In: *PRRS Compendium* [M]. 2nd ed. National Pork Board; Des Moines, IA, 2003: 51-58.
- [4] Ferrin NH, Fang Y, Johnson CR, et al. Validation of a Blocking Enzyme-Linked Immunosorbent Assay for Detection of Antibodies against Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus [J]. *Clin Vaccine Immunol*, 2004, 11(3): 503-514.
- [5] Wensvoort GK, luyver EPD. Lelystad virus, the cause of porcine epidemic abortion and respiratory syndrome; a review of mystery swine disease research at Lelystad [J]. *Vet Microbiol*, 1992, 33(1-4): 185-193.
- [6] Yoon IJ, Joo HS, Christianson WT, et al. An indirect fluorescent antibody test for the detection of antibody to swine infertility and respiratory syndrome virus in swine sera [J]. *J Vet Diagn Invest*, 1992, 4(2): 144-147.
- [7] Nodelijk G, Wensvoort G, Kroese B, et al. Comparison of a commercial ELISA and an immunoperoxidase monolayer assay to detect antibodies directed against porcine respiratory and reproductive syndrome virus [J]. *Vet Microbiol*, 1996, 49(3/4): 285-295.
- [8] 何艳嫦, 钟俊东. 兔抗人血清制备与效价的鉴定 [J]. *国际检验医学杂志*, 2011, 32(18): 2109-2110.
- [9] Snijder EJ, Meulenbeg JJM. The molecular biology of arteriviruses [J]. *J Gen Virol*, 1998, 79(5): 961-979.
- [10] Brown E, Lawson S, Welbon C, et al. Antibody Response to Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus (PRRSV) Nonstructural Proteins and Implications for Diagnostic Detection and Differentiation of PRRSV Types I and II [J]. *Clin Vaccine Immunol*, 2009, 16(5): 628-635.