

doi: 10.3969/j.issn.1008-0589.2013.01.03

PRRSV XH- GD 株 Nsp2 部分缺失感染性克隆的构建

张民泽*, 谢杰雄*, 郭泗虎, 王 衡, 闫明菲, 赵孟孟, 黄 震, 粟 硕, 孙 龙, 张桂红*

(华南农业大学 兽医学院, 广东 广州 510642)

摘 要: 为研究 Nsp2 编码区不同区域缺失对病毒体外复制的影响, 本研究在猪繁殖与呼吸综合征病毒 (PRRSV) XH-GD 株反向遗传操作平台的基础上构建了 pOK-AaBCD、pOK-AbBCD、pOK-AcBCD 等 3 种 Nsp2 编码区部分缺失的感染性重组质粒。将这 3 种感染性质粒分别转染 Marc-145 细胞进行不同 Nsp2 缺失株的病毒拯救, 结果显示, 只有在 Nsp2 编码区缺失 105 个氨基酸的缺失株 XH-GD- Δ 105 能够在 Marc-145 细胞中增殖, 表明这一缺失区域为病毒复制的非必需, 而其他两种感染性质粒则未拯救出相应的缺失重组病毒。本研究为进一步研究 Nsp2 的基因序列的缺失与 PRRSV 毒力之间的关系奠定了基础。

关键词: 猪繁殖与呼吸综合症病毒; Nsp2 部分缺失; 感染性克隆

中图分类号: S852.65

文献标识码: A

文章编号: 1008-0589(2013)01-0010-05

Construction and identification of infectious clone of partial deletion in Nsp2 for porcine reproductive and respiratory syndrome virus XH-GD strain

ZHANG Min-ze*, XIE Jie-xiong*, GUO Si-hu, WANG Heng, YAN Ming-fei, ZHAO Meng-meng,
HUANG Zhen, SU Shuo, SUN Long, ZHANG Gui-hong*

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

Abstract: Non-structural protein 2 (Nsp2) is the most variable region in porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) and it has multiple roles in polypeptide processing and replication complex formation. To investigate the role of Nsp2 in the viability and replication of PRRSV *in vitro*, three PRRSV cDNA clones of different deletion in the region of Nsp2 were constructed reverse genetic manipulation, including the cDNA clones with encoding sequence for the deletion of 210 consecutive amino acids (pOK-AaBCD), 105 amino acids (pOK-AbBCD) and 96 amino acids (pOK-AcBCD) in the Nsp2 gene of PRRSV (XH-GD strain), by respectively. However, only the recombinant virus with deletion of 105 amino acids (XH-GD- Δ 105) was rescued in MARC-145 cells transfected with pOK-AaBCD, but not other two cDNA clones. The result would be useful for further study on the relationship between Nsp2 gene deletions and pathogenic of PRRSV in pigs.

Key words: porcine reproductive and respiratory syndrome virus; partial Nsp2 gene deletion; infectious clone

猪繁殖与呼吸障碍综合征 (Porcine reproductive and respiratory syndrome, PRRS) 是由 PRRS 病毒 (PRRSV) 引起的一种以妊娠母猪严重繁殖障碍以及

仔猪的呼吸道症状和高死亡率为特征的高度接触性传染病^[1]。Nsp2 具有半胱氨酸蛋白酶活性 (Cysteine proteinase, Cp), 介导 Nsp2/Nsp3 切割, 也是 PRRSV

*Corresponding author; Equal contributors

收稿日期: 2012-05-02

基金项目: 现代农业产业技术体系建设专项资金 (CARS-36)

共同第一作者: 张民泽 (1988-), 男, 内蒙古锡林郭勒盟人, 硕士研究生, 主要从事分子病毒学研究;

谢杰雄 (1988-), 男, 湖南湘潭人, 硕士研究生, 主要从事分子病毒学研究。

* 通信作者: E-mail: guihongzh@126.com

感染细胞后最早复制及特异性的蛋白之一,也是 Nsp4 丝氨酸蛋白酶的辅助因子^[2]。不同病毒株间 Nsp2 编码区差异较大,可能与病毒对细胞或组织的嗜性有关。2006 年国内分离的高致病性 PRRSV (HP-PRRSV)在其 Nsp2 编码区第 483 位和 535 位~563 位存在不连续的 30 个氨基酸的缺失^[3],推测其致病力增强可能与 Nsp2 区域的缺失有关。但随后有研究证明该缺失与毒力增强无直接关系^[4]。相关研究表明 Nsp2 上的免疫显性表位不是病毒复制所必需,但在宿主的适应性免疫应答反应中起到一定作用^[5]。Nsp2 半胱氨酸蛋白酶结构域抑制 IFN 的调节因子 IRF-3 的激活^[6]。这些研究表明,PRRSV Nsp2 缺失型病毒株在感染动物机体的过程中发挥一定的作用。

本实验在 PRRSV XH-GD Nsp2 编码区缺失部分氨基酸序列,构建 Nsp2 部分缺失株的全长 cDNA 的重组质粒,并对拯救的重组病毒进行鉴定,进而研究这些缺失区域对病毒复制的影响。

1 材料和方法

1.1 病毒株、菌株、细胞及相关载体 美洲型 HP-PRRSV XH-GD 株、Marc-145 细胞和 BHK 细胞均由本实验室保存;感受态细胞 DH5 α 购自天根生化科技(北京)有限公司;低拷贝载体 pOKq、含有部分 PRRSV 基因片段的重组质粒 pJET-CMV-A1、pJET-A2(q)、pOK-BCD(c)及 PRRSV 全长 cDNA 的重组质粒 pOK-A2BCD 由本实验室制备保存。

1.2 主要试剂 RNA 提取试剂 TRIzol[®] Reagent、platinum[®] pfx DNA 聚合酶、Superscript[™] 反转录酶、platinum R pfx DNA 聚合酶、RNaseH (RNA 酶 H)、RNase OUT RNA 酶抑制剂、TRIzol R Reagent 和脂质体 DMRIE-C 和脂质体 lipofectamine 2000 均购自 Invitrogen 公司;DNA Marker 及 LA PCR[™] Kit Ver.2.1 均购自 TaKaRa 公司;限制性内切酶及 T4 DNA 连接酶均购自 NEB 公司;DNA 纯化试剂盒 E.Z.N.A.[™] Gel Extraction Kit 和质粒快速提取试剂盒 E.Z.N.A.[™] Plasmid Mini Kit 购自 Omega 公司;Clone JET PCR Cloning Kit 购自 Fermentas 公司;Opti-MEM I 无血清培养基购自 Gibco 公司;抗美洲型 PRRSV M 蛋白的单克隆抗体(MAb)由中国农业科学院上海兽医研究所惠赠。

1.3 Nsp2 蛋白部分缺失区域的选择 根据序列比对分析表明 Nsp2 的 321 位~530 位处于 Nsp2 可耐受插入或缺失突变等操作的中间高变区,同时该位置包括了自然 29+1 个氨基酸不连续缺失中的 480 位缺失,以及 3 个最新鉴定的抗原表位,为了解 Nsp2 该区域的生物学特性,选择出下列区域进行缺失研究。缺失位置如图 1 所示:

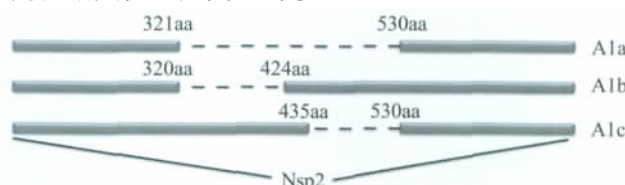


图 1 PRRSV XH-GD Nsp2 缺失位点的设计
Fig.1 Design of PRRSV XH-GD Nsp2 deletion sites

1.4 引物的设计及合成 在本实验室构建的 DNA-launched 的反向遗传操作平台 -PRRSV XH-GD 株全长感染性克隆的基础上进行引物的设计^[7]。应用 Primer Premier 5.0 软件设计引物用于扩增缺失部位的上游和下游片段(表 1),对 A1 片段进行改造。引物由上海英骏生物技术有限公司合成。

表 1 设计引物用以改造 A1 片段
Table 1 Primer design for fragment A1 reconstruction

引物 Primer	引物序列(5'-3') Primer sequences (5'-3')
A1a-1F	AGTCGCGGCCGCGGATGTACGGCCAGATATAC (Not)
A1a-1R	AGGCTCATCCTGGTGCCTCAGCGTTGTTGTCAAAGGCT CTTGAGTCACGGGA
A1a-2F	CCCTGGTCCCTCCCGTGACTCAAGAGCCTTTGACAACA ACGCTGACGCACCA
A1a-2R	AGGTGCAGGCGTGTGAGGTAACATC
A1b-1F	AGTCGCGGCCGCGGATGTACGGCCAGATATAC (Not)
A1b-1R	ATTCTTCGAGGTTGAACTCTCTTGTAGTCACGGGAGGGACAGG
A1b-2F	TCCCTCCCGTGACTCAAGAGAGAGTTCAACCTCGAAGAAATAAAGT
A1b-2R	AGGTGCAGGCGTGTGAGGTAACATC
A1c-1F	AGTCGCGGCCGCGGATGTACGGCCAGATATAC (Not)
A1c-1R	CATCCTGGTGCCTCAGCGTTGTTGTTGGTGGAGGGGTGGTGGTG
A1c-2F	GTGGACACCAACCCCTCCACCAACAACAACGCTGACGCACCA
A1c-2R	AGGTGCAGGCGTGTGAGGTAACATC

1.5 pOK-Aa、pOK-Ab、pOK-Ac 质粒的构建 基因缺失片段 A1a、A1b 及 A1c 上下游片段的扩增,回收后进行融合 PCR 扩增,回收纯化产物与 pJET 1.2 Blunt Vector 载体进行连接,测序正确后从菌液提取重组质粒,将双酶切后回收纯化的产物 A1a、A1b、A1c 基因片段与 A2 及 pOKq 进行连接,使用 NEB T4 DNA 连接酶对得到的双酶切产物进行连接,转化,测序鉴定。

1.6 Nsp2 部分缺失全长质粒的构建 用限制性内切酶 Not 和 Afl 对 pOK-Aa、pOK-Ab、pOK-Ac

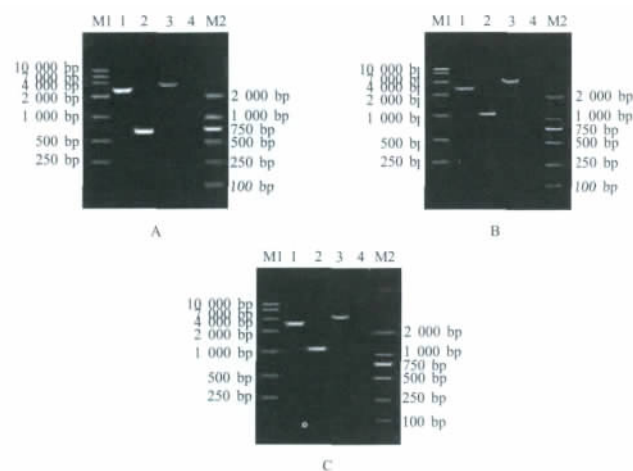
及 pOK-BCD 进行酶切, 将双酶切后回收纯化的产物 Aa、Ab、Ac 基因片段分别与同样酶切处理的 pOK-BCD 进行连接, 连接产物进行 *Not* -HFTM 单酶切鉴定, 并分别将构建的感染性克隆转染 BHK-21 细胞进行病毒拯救^[8]。

1.7 拯救病毒的稳定性分析及 RT-PCR 鉴定 将拯救病毒连续在 Marc-145 细胞中传至 12 代, 并对 1、3、6、9、12 代进行 TCID₅₀ 测定。通过设计与合成鉴别引物进行 PCR 扩增测序鉴定。鉴别引物: F: 5'-GTTCTGAGCTTGGGGTGCT-3'; R: 5'-CGAATTCTTTGTACTGAAC-3'

1.8 间接免疫荧光试验(IFA)检测 利用 BHK-21 细胞转染后上清接种 Marc-145 细胞按常规方法进行 IFA 检测, 一抗为美洲型 MAb M 蛋白 1:100 倍稀释, 二抗为 1:1 000 稀释 FITC 标记的羊抗鼠抗体, 同时设正常的细胞作空白对照。

2 结果

2.1 A1a、A1b、A1c 上下游片段的扩增、融合及测序结果 以质粒 pJET-CMV-A1 为模板, 采用上述 6 对引物分别对 A1a、A1b、A1c 基因片段的上下游进行 PCR 扩增, 分别得到目的片段长度分别约为: A1a, 2 800 bp、720 bp、3 500 bp (图 2A); A1b 2 800 bp、1 000 bp、3 800 bp (图 2B); A1c, 3 100 bp、720 bp、3 900 bp (图 2C), 均与预期大小相符, 测序结果显示与设计缺失位点一致。



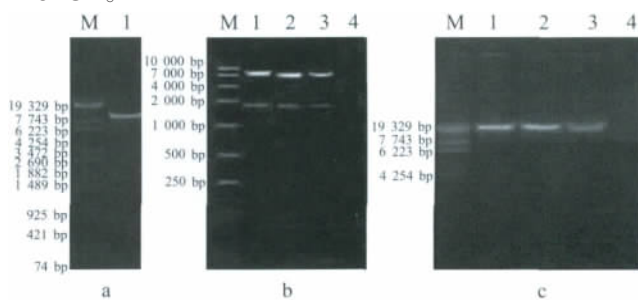
M1: DNA Marker DL10000; M2: DNA Marker DL2000; 1-2: Upstream and downstream of A1a, A1b, A1c fragments respectively; 3: Amplification of A1a, A1b, A1c fragments; 4: Negative control

图 2 A1a、A1b、A1c 上下游片段的 RT-PCR 扩增及融合

Fig.2 Amplification and fusion of fragments A1a, A1b and A1c by PCR

2.2 pOK-Aa、pOK-Ab、pOK-Ac 重组质粒的构建 将重组质粒 pJET-A1a、pJET-A1b、pJET-A1c 分别用 *Not* -HFTM、*Xho* 进行双酶切后得到大约为 2 800 bp 的 pJET1.2/blunt 载体片段和约 3 500 bp 的 A1a 片段、约 3 800 bp 的 A1b 和 A1c 片段, 与预期大小相符, 将 pJET-A2 进行 *Xho* /*Afl* 双酶切, 得到约为 2 800 bp 的 pJET 1.2/blunt 载体片段和 3 100 bp 的 A2 目的片段, 与预期大小相符, 鉴定为阳性的菌液由上海英潍捷基生物技术有限公司进行测序, 测序正确的重组质粒分别命名为 pOK-Aa、pOK-Ab、pOK-Ac。

2.3 Nsp2 部分缺失全长 cDNA 质粒的构建 将重组质粒 pOK-BCD 用 *Not* -HFTM、*Afl* 进行双酶切, 得到约为 11 kb 的 BCD 片段, 与预期大小相符 (图 3a)。将重组质粒 pOK-Ab 用 *Not* -HFTM、*Afl* 进行双酶切, 获得约为 7 000 bp 的 Ab 与大约 1 800 bp 的 pOK 载体片段, 与预期大小相符 (图 3b)。将二者连接转化后抽提质粒, 通过 *Not* -HFTM 进行单酶切, 得到约为 18 kb 的目的片段, 与预期大小相符 (图 3c)。同时, 鉴定为阳性的菌液由上海英潍捷基生物技术有限公司进行测序, 测序正确的重组质粒分别命名为 pOK-AaBCD、pOK-AbBCD 和 pOK-AcBCD。



a: Restriction of pOK-BCD plasmid (M: λ -EcoT14 I digest DNA Marker; 1: pOK-BCD digested with *Not* I -HFTM, *Afl* II);
b: Restriction of pOK-Aa, pOK-Ab, pOK-Ac (M: DNA Marker DL10000; 1-3: pOK-Aa, pOK-Ab, pOK-Ac digested with *Not* I -HFTM, *Afl* II; 4: Negative control);
c: The full-length restructuring plasmid digested with *Not* I -HFTM (M: λ -EcoT14 I digest DNA Marker; 1-3: pOK-AaBCD pOK-AbBCD pOK-AcBCD digested with *Not* I -HFTM; 3: Negative control)

图 3 Nsp2 部分缺失全长 cDNA 质粒的构建

Fig.3 Construction of full-length Nsp2 partial deletion cDNA vector

2.4 转染细胞上清接种 Marc-145 细胞的病变结果 将构建的 PRRSV XH-GD 株 Nsp2 部分缺失的全长 cDNA 质粒克隆 pOK-AbBCD 转染 BHK-21 细胞 3 d 后收取细胞上清, 离心后分别接种 Marc-145 细胞。

其中, pOK-AbBCD 的转染细胞上清接种 Marc-145 细胞 72 h 后开始出现细胞病变(CPE)。而 pOK-AaBCD、pOK-AcBCD 及正常细胞对照组均无 CPE, 亲本病毒株出现明显的 CPE, 将该拯救病毒命名为 XH-GD- Δ 105。

2.5 XH-GD- Δ 105 的稳定性及与亲本毒 TCID₅₀ 比较 取 XH-GD- Δ 105 和未缺失拯救病毒及亲本毒接种 Marc-145 细胞进行体外传代, 对 1 代、3 代、6 代、9 代、12 代细胞病毒液进行 TCID₅₀ 测定, 亲本病毒、未缺失拯救毒和 XH-GD- Δ 105 病毒滴度比较情况如图 4, XH-GD- Δ 105 病毒滴度明显低于亲本毒及未缺失拯救毒, 而两者几乎保持一致。

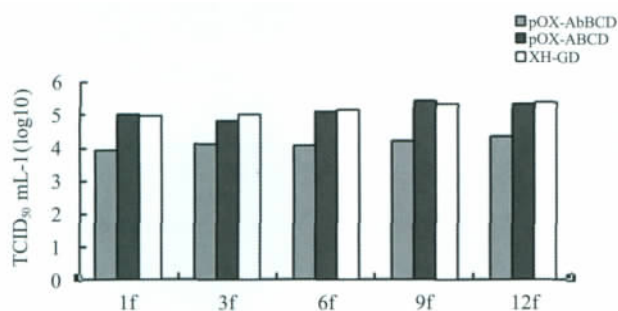
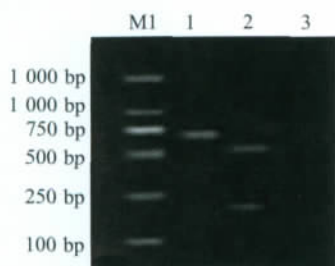


图 4 亲本毒与拯救毒稳定性比较

Fig.4 Comparison between parental and rescued virus in stability

2.6 拯救病毒的 RT-PCR 鉴定 利用鉴别引物对在 Marc-145 细胞中 3 代、6 代、9 代、12 代的拯救病毒进行鉴定, 并设亲本病毒株 XH-GD 做阳性对照。拯救病毒及亲本病毒扩增片段分别约为 750 bp, 与预期大小相符。与亲本病毒 XH-GD 相比, 拯救病毒的 3 代、6 代、9 代、12 代在 510 位核苷酸位点突变与沉默突变设计相符, 该位点突变后引入酶切位点 *Fse* (GGCCG GCC), 与预期结果一致。利用限制性内切酶 *Fse* 对拯救病毒的第 12 代进行酶切鉴定(图 5), 可见约 540 bp 和 200 bp 的目的片段, 与预期结果一致。

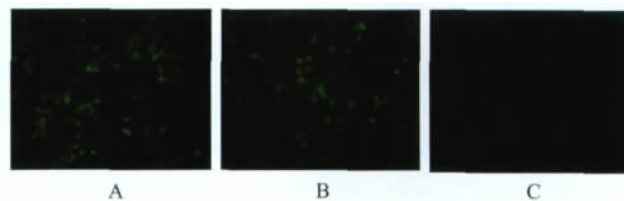


M: DNA Marker DL2000; 1: Identification of rescued virus by specific primer; 2: Rescued virus digested with *Fse* I; 3: Negative control

图 5 拯救病毒全长 cDNA 遗传标记处的 PCR 扩增

Fig.5 Identification of rescued virus by enzyme digestion

2.7 拯救病毒的 IFA 鉴定 亲本病毒和拯救病毒分别接种 Marc-145 细胞进行 IFA 检测。结果显示, 接种 XH-GD- Δ 105 第一代及亲本毒 PRRSV XH-GD 的细胞可被 M 蛋白 MAb 所识别, 有特异性的荧光产生, 而对照组细胞未见荧光(图 6)。



A: Marc-145 cells infected with parental virus; B: Marc-145 cells infected with pOK-AbBCD; C: Normal Marc-145 cells

图 6 拯救病毒 pOK-AbBCD 的 IFA 试验鉴定结果($\times 100$)

Fig.6 Identification of rescued virus in Marc-145 cells by IFA ($\times 100$)

3 讨论

Nsp2 是 PRRSV 中变异性最高并且最具有免疫原性的多结构域蛋白^[9], 目前已鉴定 Nsp2 至少具有 4 个功能区^[10]。Nsp2 中间的高变区具有耐受插入、缺失、突变的能力。同时, Nsp2 具有多个抗原表位^[11]。本研究 PRRSV Nsp2 缺失位置为 320 位~530 位, 该位置包括自然缺失的第 481 及 29 个氨基酸自然缺失前的部分区域, 并且包括了³³⁵D~³⁹⁴,⁴⁵²P~⁴⁶⁶,⁴⁶⁷P~⁵²⁷等 3 处抗原表位, 为了解 PRRSV 在自然缺失后能否在缺失前位置发生进一步的缺失, 以及在缺失多个抗原表位后其生长特性及免疫原性的变化, 进行了该区域的缺失研究。

由于本实验所构建的 PRRSV XH-GD 株 Nsp2 部分缺失的感染性克隆能够在体外 Marc-145 细胞中复制, 拯救毒 XH-GD- Δ 105 在 Marc-145 细胞中能够稳定传代, 表明了 Nsp2 的 320 位~424 位氨基酸处存在缺失对于 PRRSV XH-GD 的复制是非必需的, 不会影响其体外的增殖。同时其病毒滴度明显低于亲本株, 表明该缺失区域对于病毒的毒力可能存在一定影响, 然而 Nsp2 编码区这 105 个氨基酸的缺失是否会对亲本株毒力造成影响, 还需要后续进行动物实验进行进一步研究。由于本实验设计的 pOK-AaBCD 是在 Nsp2 的 321 位~530 位氨基酸处存在缺失, 覆盖了 pOK-AbBCD 的 Nsp2 编码区缺失的 320 位~424 位氨基酸位点及 pOK-AcBCD 的 Nsp2 编码区缺失的 435 位~530 位氨基酸位点, 而实验中

pOK-AaBCD 及 pOK-AcBCD 这两个全长重组质粒没有拯救出来,与 Han 等针对 VR2332 株 Nsp2 进行不同部位的缺失,发现在 324 位~523 位,324 位~726 位等处缺失能够拯救出病毒的结果不一致^[12],这可能是由于存在病毒株特异性。另外,本研究中缺失位点从 320 位开始,相比 VR2332 缺失来说本研究缺失位置更接近保守区序列,因此可能与所设计的 pOK-AcBCD 的 Nsp2 编码区缺失的 435 位~530 位氨基酸位点和高变区前保守序列共同影响有关,该缺失区域及前列保守区是否含有与病毒复制相关的必需因子还有待于进一步研究。

本研究构建基于亲本病毒株 PRRSV XH-GD 的 3 个 Nsp2 部分缺失的全长 cDNA 质粒,分别命名为 pOK-AaBCD、pOK-AbBCD 和 pOK-AcBCD,由于 XH-GD-Δ105 在 Nsp2 编码区的 320 位~424 位氨基酸存在缺失,但这一缺失区域并没有影响到病毒的复制,表明这一区域对病毒的复制是非必需的。

参考文献:

- [1] Oleksiewicz M B, Botner A, Toft P, et al. Epitope mapping porcine reproductive and respiratory syndrome virus by phage display: the Nsp2 fragment of the replicase polyprotein contains a cluster of B-cell epitopes [J]. J Virol, 2001, 75(7): 3277-3290.
- [2] Fang Ying, Snijder E J. The PRRSV replicase: exploring the multifunctionality of an intriguing set of nonstructural proteins [J]. Virus Res, 2010, 154(1-2): 61-76.
- [3] Tong Guang-zhi, Zhou Yan-jun, Hao Xiao-fang, et al. Highly pathogenic porcine reproductive and respiratory syndrome, China [J]. Emerg Infect Dis, 2007, 13(9): 1434-1436.
- [4] Zhou Lei, Zhang Jia-long, Zeng Jing-wen, et al. The 30-amino-acid deletion in the Nsp2 of highly pathogenic porcine reproductive and respiratory syndrome virus emerging in China is not related to its virulence [J]. J Virol, 2009, 83(10): 5156-5167.
- [5] Chen Zhen-hai, Zhou Xiao-xin, Lunney J K, et al. Immunodominant epitopes in Nsp2 of porcine reproductive and respiratory syndrome virus are dispensable for replication, but play an important role in modulation of the host immune response [J]. J Gen Virol, 2010, 91(4): 1047-1057.
- [6] Li Hong-xia, Zheng Zhen-hua, Zhou Peng, et al. The cysteine protease domain of porcine reproductive and respiratory syndrome virus non-structural protein 2 antagonizes interferon regulatory factor 3 activation [J]. J Gen Virol, 2010, 91(12): 2947-2958.
- [7] 吴欣伟,熊永忠,秦宏阳,等.猪繁殖与呼吸综合征病毒 XH 株感染性克隆的构建[J].中国预防兽医学报,2011(2): 97-100.
- [8] Nia Y Y, Huang Y W, Cao D J, et al. Establishment of a DNA-launched infectious clone for a highly pneumovirulent strain of type 2 porcine reproductive and respiratory syndrome virus: Identification and *in vitro* and *in vivo* characterization of a large spontaneous deletion in the Nsp2 region [J]. Virus Res, 2011, 160(1-2): 264-273.
- [9] Oleksiewicz M B, Botner A, Toft P, Normann P, et al. Epitope mapping porcine reproductive and respiratory syndrome virus by phage display: the Nsp2 fragment of the replicase polyprotein contains a cluster of B-cell epitopes [J]. J Virol, 2001, 75: 3277-3290.
- [10] Music N, Gagnon C A. The role of porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) virus structural and non-structural proteins in virus pathogenesis [J]. Anim Health Res Rev, 2010, 11(2): 135-163.
- [11] Yan Yu-lin, Guo Xin, Ge Xin-na, et al. Monoclonal antibody and porcine antisera recognized B-cell epitopes of Nsp2 protein of a Chinese strain of porcine reproductive and respiratory syndrome virus [J]. Virus Res, 2007, 126(1-2): 207-215.
- [12] Han Jun, Liu Gong-ping, Wang Yue, et al. Identification of nonessential regions of the Nsp2 replicase protein of porcine reproductive and respiratory syndrome virus strain VR-2332 for replication in cell culture [J]. J Virol, 2007, 81(18): 9878-9890.

(本文编辑:彭永刚)