

刘凯, 冯康, 熊江广, 等. 猪繁殖与呼吸综合征病毒非结构蛋白 NSP9 的表达纯化及多克隆抗体的制备 [J]. 畜牧与兽医, 2025, 57 (8): 108-114.

LIU K, FENG K, XIONG J G, et al. Expression and purification of PRRSV non-structural protein NSP9 and preparation of its polyclonal antibody [J]. Animal Husbandry & Veterinary Medicine, 2025, 57 (8): 108-114.

猪繁殖与呼吸综合征病毒非结构蛋白 NSP9 的表达纯化及多克隆抗体的制备

刘凯^{1,2}, 冯康^{1,3}, 熊江广¹, 王文清¹, 张志榜¹, 李鹏成¹, 张锦华², 张晓燕^{1*}

(1. 宜春学院生命科学与资源环境学院/动物病原微生物实验室, 江西 宜春 336000;

2. 江西农业大学动物科学技术学院, 江西 南昌 330045;

3. 山西农业大学动物医学院, 山西 晋中 030801)

摘要: 旨在获得猪繁殖与呼吸综合征病毒 (PRRSV) 的非结构蛋白 NSP9 及制备 PRRSV NSP9 的多克隆抗体。本研究应用 PCR 技术扩增出全长 NSP9 目的基因, 将其克隆至原核表达载体 pET-28a 中, 同时插入 His 和 Flag 融合标签, 获得重组质粒 pET-28a-NSP9; 然后将重组质粒转化至 BL21 感受态细胞, 经 IPTG 诱导并优化诱导温度和时间, SDS-PAGE 和 Western blot 鉴定, 观察 NSP9 蛋白的表达情况, 确定 NSP9 蛋白的最佳表达条件, 应用镍柱亲和层析纯化 NSP9 蛋白; 最后将纯化后的 NSP9 蛋白免疫 BALB/c 小鼠, 获得多克隆抗体, 用 ELISA 测定抗体效价, Western blot 鉴定抗体反应原性。结果: 含有 pET-28a-NSP9 重组质粒的大肠杆菌, 在 IPTG 终浓度为 0.2 mmol/L 诱导, 16 °C 培养 32 h 的条件下, NSP9 蛋白主要以可溶性形式表达, 经镍柱亲和层析纯化成功获得高纯度的 NSP9 蛋白, 经间接 ELISA 和 Western blot 测定成功获得特异性的 NSP9 多克隆抗体。综上, 本研究以全长 NSP9 基因为模板, 克隆转化后表达出 72 kDa 左右的可溶性重组蛋白, 利用其作为抗原免疫制备的抗 PRRSV 多克隆抗体具备良好的生物活性, 为后续 PRRSV 检测、免疫血清诊断试剂的研发及研究 PRRSV NSP9 的生物学功能奠定了重要基础。

关键词: 猪繁殖与呼吸综合征病毒; NSP9; 原核表达; 蛋白纯化; 多克隆抗体

中图分类号: S852.65

文献标志码: A

文章编号: 0529-5130(2025)08-0108-07

Expression and purification of PRRSV non-structural protein NSP9 and preparation of its polyclonal antibody

LIU Kai^{1,2}, FENG Kang^{1,3}, XIONG Jianguang¹, WANG Wenqing¹, ZHANG Zhibang¹,

LI Pengcheng¹, ZHANG Jinhua², ZHANG Xiaoyan^{1*}

(1. College of Life Science and Resources and Environment/Laboratory of Animal Pathogenic Microbiology, Yichun University, Yichun 336000, China;

2. College of Animal Science and Technology, Jiangxi Agricultural University, Nanchang 330045, China;

3. College of Veterinary Medicine, Shanxi Agricultural University, Jinzhong 030801, China)

Abstract: The aim of this study was to obtain a nonstructural protein NSP9 of porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) and to prepare polyclonal antibodies against PRRSV NSP9. Firstly, the full-length NSP9 target gene was amplified by PCR and was cloned into the prokaryotic expression vector pET-28a. Then, the His and Flag fusion tags were inserted at the same time to obtain the recombinant plasmid pET-28a-NSP9. Next, the recombinant plasmid was transformed into BL21 receptor cells, and was identified by IPTG induction, optimization of induction temperature and time, and by SDS-PAGE and Western blot. Thirdly, the expression of NSP9 protein was observed to determine the optimal expression conditions of NSP9 protein. Nickel column affinity chromatography was employed to purify NSP9 protein. Finally, the purified NSP9 protein was immunized into BALB/c mice to obtain polyclonal antibodies, and the antibody potency was determined by ELISA and antibody reactivity was identified by Western blot. The results showed that *E. coli* containing pET-28a-NSP9

收稿日期: 2024-10-30; 修回日期: 2025-06-09

基金项目: 国家自然科学基金项目 (31960697, 32260880); 江西省“双千计划”项目 (jxsq2019101056)

第一作者: 刘凯, 男, 硕士研究生

* 通信作者: 张晓燕, 讲师, 主要从事动物疫病致病机制及防控研究, E-mail: zxy09161021@126.com。

recombinant plasmids was induced by final concentration of 0.2 mmol/L IPTG and cultured at 16 °C for 32 h. The NSP9 protein was mainly expressed in a soluble form. High purity NSP9 protein was successfully obtained by nickel column affinity chromatography purification. The specific NSP9 polyclonal antibody was also successfully obtained by indirect ELISA and Western blot. In conclusion, in the present study, the full-length NSP9 gene was used as a template, cloned and transformed to express a soluble recombinant protein of about 72 kDa in size, and its prepared polyclonal antibody against PRRSV possessed good biological activity. The results of this experiment laid an important foundation for the development of PRRSV detection and immunological serodiagnostic reagents and for further research on the biological function of PRRSV NSP9.

Keywords: PRRSV; NSP9; prokaryotic expression; protein purification; polyclonal antibodies

猪繁殖与呼吸综合征 (porcine reproductive and respiratory syndrome, PRRS) 主要是由猪繁殖与呼吸综合征病毒 (porcine reproductive and respiratory syndrome virus, PRRSV) 引起猪繁殖障碍和呼吸困难的一种传染病, 其特征是妊娠母猪繁殖障碍, 表现为流产、产死胎、木乃伊胎, 由于部分病猪耳部发紫, 故俗称“猪蓝耳病”^[1]。PRRS 是影响世界养猪业经济最重要的疾病之一^[2]。该病毒基因组为单股正链 RNA, 全长 15 kb 左右, PRRSV 基因组至少包括 11 个已知的开放阅读框 (open reading frame, ORF)。ORF1a 和 ORF1b, 占据整个 PRRSV 基因组 75% 左右, 并编码 16 个不同的非结构蛋白酶 (NSPs), 包括 NSP1 α/β 、NSP2-6、NSP7 α/β 、NSP8、NSP9、NSP10、NSP11、NSP12、NSP2TF 和 NSP2N, 这些蛋白主要在病毒的复制和免疫调节中发挥作用^[3]。NSP9 是 PRRSV 的 RNA 依赖的 RNA 聚合酶 (RNA-dependent RNA polymerase, RdRp), 直接决定病毒自身复制^[4-6]。RdRp 仅在病毒复制过程中存在, 针对 RdRp 融合蛋白的抗原设计可有效区分野毒株与灭活疫苗毒株, 具有诊断意义^[7]。因此, PRRSV NSP9 的相关研究, 对病毒的致病机制、诊断和检测试剂的研发等具有重要价值。

PRRSV 的主要特征之一是病毒基因型的多样性^[8]。PRRSV 是迄今为止报道的最容易变异的 RNA 病毒^[9]。NSP9 是影响该病毒复制和致病力的决定性基因之一^[10]。NSP9 也可通过泛素蛋白酶体途径下调宿主细胞视网膜母细胞瘤蛋白 (Rb) 水平, 而 Rb 对 PRRSV 的复制起抑制作用, 拮抗 Rb 有利于病毒增殖, 同时可促进细胞周期进入 S 期, 利于病毒复制^[11]。因此, 对 NSP9 的研究将有利于探索病毒和宿主之间的互作关系^[12]。

病毒入侵宿主是一个复杂的生物学过程, 直接研究它们之间的关系非常难, 我们可以用非结构蛋白 NSP9 制备的抗体作为切入点, 间接探究病毒致病机理中功能的作用。目前 PRRSV 的复制机制还未研究清楚, NSP9 抗体制备可为研究 PRRSV 复制机制等提供工具材料。本研究利用原核表达系统表达和纯化 NSP9 蛋白并获得多克隆抗体, 为 NSP9 蛋白决定病

毒复制的作用机制研究, PRRSV 检测, 免疫血清诊断试剂、抗病毒药物和疫苗等的研发奠定基础。

1 材料与方法

1.1 毒株、菌株和实验动物

PRRSV-NJ 毒株, pET-28a 表达载体 (含 6 \times His 标签, 位于 NSP9 的 N 端), 大肠杆菌 BL21 感受态细胞, 由宜春学院动物病原微生物实验室所保存; 大肠杆菌 DH5 α 感受态细胞购自北京擎科生物科技有限公司; 6~8 周龄的 BALB/c 小鼠购自湖南斯莱克景达实验动物有限公司。

1.2 主要试剂

化学发光液购自 Affinity Bioscience; 抗 Flag 直标抗体购自 Abmart; DNA Marker 购自宝日医生物技术 (北京) 有限公司; QuickAntibody-Mouse 免疫佐剂、HRP 标记的山羊抗小鼠 IgG 均购自苏州博特龙免疫技术有限公司; DNA 回收试剂盒购自江苏康为世纪生物科技有限公司; 快速质粒小提试剂盒购自天根生化 (北京) 有限公司; 蛋白 Marker、His 标签蛋白纯化镍柱、BCA 蛋白定量试剂盒购自上海碧云天生物技术有限公司。

1.3 引物的设计与合成

通过 NCBI 基因数据库获取 PRRSV NSP9 的全基因序列, 然后运用 SnapGene 软件设计 1 对携带限制性内切酶 (下划线部分) 的 NSP9 特异性引物, 并插入 Flag (斜体部分) 蛋白标签, 由安升达生物科技有限公司合成, 其序列如下: NSP9-F (*Xho* I): 5'-CCACATATGATGTTTAAACTGCTAGCCGCCAGC-3'; NSP9-R (*Nde* I): 5'-CCACTCGAGTTACTTGT-CATCGTCGTCCTTGTAACTCCTCATGATTGACCTGAGT-TTTT-3'。

1.4 基因扩增与原核表达质粒的构建

使用 TRIzol 抽提法提取 PRRSV-NJ 毒株 RNA, 然后按照 TaKaRa PrimeScriptTM II 1st Strand cDNA Synthesis Kit 说明书进行反转录。以反转录产物 cDNA 为模板, 利用 PRRSV NSP9 引物进行 PCR 扩增目的基因。然后通过 1% 琼脂糖凝胶电泳检测及分析 PCR 产物, 再参照 DNA 回收试剂盒说明书进行切胶回收。

针对 NSP9 基因片段和 pET-28a 载体质粒, 同时用限制性内切酶 *Xho* I 和 *Nde* I 分别进行双酶切。然后通过 1% 琼脂糖凝胶电泳检测及分析酶切产物, 再参照 DNA 回收试剂盒说明书进行切胶回收。将纯化回收的目的片段 NSP9 与载体片段 pET-28a, 按 1 : 4 比例 16 °C 条件下连接过夜。

先取 2 μ L 连接产物转化至大肠杆菌 DH5 α 中, 然后涂布于含卡那的 LB 琼脂平板上, 37 °C 培养 14 h, 挑取单个菌落进行 PCR 鉴定。根据 PCR 结果选取阳性菌落扩大培养, 并提取其质粒, 送往上海生工 Sangon Biotech 公司测序, 将测序正确的阳性质粒命名为 pET-28a-NSP9。

1.5 蛋白表达、鉴定与可溶性分析

取质粒 pET-28a-NSP9 转化至 BL21 感受态细胞中, 涂布于含卡那霉素 (Kan) 的 LB 琼脂平板上, 37 °C 培养 14 h, 挑取单个菌落接种于含 Kan 的 LB 培养液中, 37 °C 摇床培养 14 h。取该菌液 1% 接种于含 Kan 的液体 LB 培养基中, 待细菌培养至对数生长期, 即 OD_{600} 值为 0.6 左右时, 加入 IPTG 至溶液终浓度为 0.2 mmol/L 诱导表达, 37 °C 摇床培养 4 h, 取 1 mL 诱导后的菌液, 12 000 r/min 离心 1 min 去上清液, 加入 1 mL PBS 重悬, 重悬后的菌体放在冰上超声破碎, 菌液由浑浊转为清亮时, 12 000 r/min 离心 3 min 分离上清液与沉淀。在未诱导、诱导后全菌蛋白、超声后上清液、超声后沉淀共 4 个蛋白样品中, 分别加入 SDS Loading Buffer 混匀, 金属浴 10 min, 然后将蛋白样品置于冰上迅速冷却后备用。

取上述制好的蛋白样品进行 SDS-PAGE 分析, 其具体步骤为: 配制 10% 浓度的分离胶和 5% 浓度的浓缩胶, 先在 80 V 下跑至浓缩胶底部, 再调至 120 V 跑至分离胶底部, 然后取下分离胶置于考马斯亮蓝 G250 染色液中, 室温水平摇床 40 r/min 缓慢摇动 2 h 染色。再将分离胶置于考马斯亮蓝 G250 脱色液中, 室温缓慢摇动脱色, 2 h 换一次脱水液, 至分离胶背景透明。另取同样处理的 SDS-PAGE 分离胶, 进行 Western blot 鉴定, 其具体步骤为: 100 V 转印 1.5 h, 取 NC 膜放入 5% 脱脂乳的 TBST 中封闭 60 min, TBST 洗涤 3 次, 再用 Flag 直标抗体孵育 1 h, TBST 洗涤 3 次。最后在 NC 膜上滴加化学发光液, 在显影仪中曝光显影。

1.6 蛋白表达条件优化

取培养好的菌液, 按 1% 接种于含卡那的液体 LB 培养基中, 待细菌培养至对数生长期, 即 OD_{600} 值为 0.6 左右时, 加入 IPTG 至溶液终浓度 0.2 mmol/L 诱导表达, 16 °C 摇床振荡培养, 并分别在诱导前、诱导后 4、8、12、16、20、24、28、32、36 h 收集菌

液, 同时设立空载体对照, 取制好的蛋白样品进行 SDS-PAGE 分析, 具体步骤参考 1.5。

1.7 重组蛋白大量表达及纯化

利用镍柱亲和层析纯化的方式对可溶性重组蛋白 NSP9 进行纯化。配制平衡/洗涤缓冲液, 20 mmol/L TrisCl (pH = 7.4)、300 mmol/L NaCl、10 mmol/L/30 mmol/L 咪唑、0.1% Triton X-100; 配制裂解缓冲液, 50 mmol/L TrisCl (pH = 7.4)、150 mmol/L NaCl、250 mmol/L 咪唑。大量表达含重组载体 pET-28a-NSP9 的大肠杆菌, 离心去上清液, 用平衡缓冲液重悬菌体, 超声破碎菌液, 收集超声后上清液, 用平衡缓冲液平衡镍柱, 洗涤缓冲液清洗 Ni-NTA Beads, 将 Beads 加入超声上清液中, 4 °C 孵育 4 h, 待 NSP9 上的 His 标签与 Beads 结合后, 过镍柱, 用洗涤缓冲液洗 Beads, 分多次使用裂解缓冲液洗脱 NSP9 蛋白, 分别收集。参照 BCA 蛋白定量试剂盒说明书对纯化的 NSP9 蛋白进行浓度检测, 依照标准曲线计算出目的蛋白浓度。

1.8 纯化蛋白的 SDS-PAGE 与 Western blot 鉴定

取上述制好的蛋白进行 SDS-PAGE 分析, 取同样处理的 SDS-PAGE 分离胶进行 Western blot 鉴定, 其具体步骤参考 1.5。

1.9 多克隆抗体的制备

将具有活性的纯化蛋白与免疫佐剂 1 : 1 混合均匀, BALB/c 小鼠分为试验组 (3 只) 和对照组 (1 只)。试验组按每只小鼠 50 μ g 蛋白免疫, 通过后腿小腿肌肉注射, 对照组注射生理盐水。分别间隔 14 d 进行二免和三免, 三免结束 1 周后静脉采血并分离血清。

1.10 间接 ELISA 测定多克隆抗体的效价

将 PRRSV NSP9 纯化蛋白稀释到相应浓度来包被 96 孔板, 每孔 100 μ L, 孵育 1 h, 用 TBST 洗涤, 每孔再加入 200 μ L 5% 脱脂牛奶 37 °C 封闭 1 h, 用 TBST 洗 3 次, 然后稀释阴性和阳性小鼠血清至 1 : 5 000、1 : 10 000、1 : 20 000、1 : 40 000、1 : 80 000、1 : 160 000、1 : 320 000、1 : 640 000、1 : 1 280 000、1 : 2 560 000 加入 96 孔板中孵育一抗, 每孔 100 μ L, 孵育 2 h, 用 TBST 洗 3 次, 再加入 HRP 标记的山羊抗鼠 IgG 孵育二抗, 每孔 100 μ L, 孵育 1 h, 用 TBST 洗 3 次, TMB 显示 15 min, 再每孔加入 100 μ L 硫酸终止反应。测定阳性血清 OD_{450} 值为 P, 阴性血清 OD_{450} 值为 N, 以 $P/N \geq 2.1$ 为判定标准。

1.11 多克隆抗体的 Western blot 鉴定

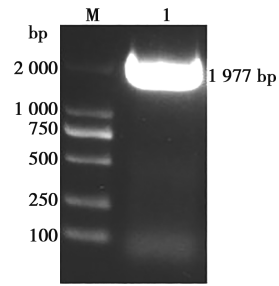
用 PRRSV 感染 MARC-145 细胞, 同时设立未被 PRRSV 感染的 MARC-145 细胞作为对照, 37 °C 温箱

培养 48 h 后, 收集细胞, 加入细胞裂解液, 冰上裂解 30 min, 12 000 r/min 4 ℃ 离心 15 min 收集上清液, 加入 SDS Loading Buffer 制备蛋白样品。将该蛋白样品经 SDS-PAGE 后, 取分离胶进行 Western blot 鉴定, 其具体步骤为: 100 V 转印 1.5 h, 取 NC 膜放入 5% 脱脂乳的 TBST 中封闭 60 min, TBST 洗 3 次, 用上述制备得到的多克隆抗体作为一抗 4 ℃ 过夜孵育, TBST 洗 3 次, 加入 HPR 标记的山羊抗鼠 IgG 作为二抗室温孵育 1 h, TBST 洗 3 次, 在 NC 膜上滴加化学发光液, 在显影仪中曝光显影。

2 结果与分析

2.1 NSP9 PCR 扩增

通过 PRRSV-NJ 毒株提取 RNA, 进行反转录合成 cDNA, 以反转录产物 cDNA 为模板, 利用 PRRSV NSP9 的特异性引物进行 PCR 扩增, 核酸电泳分析 PCR 产物, 获得约为 1 977 bp 大小的 DNA 片段, 与预期结果相符 (图 1)。

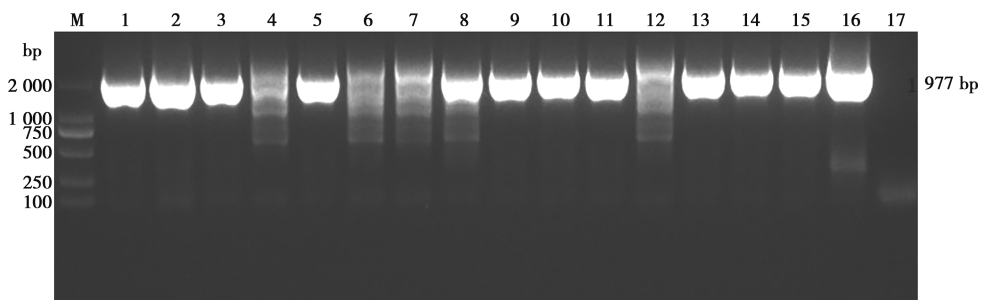


M. DNA Marker; 1. NSP9 扩增基因。

图 1 PCR 扩增 NSP9 基因

2.2 重组载体的鉴定

针对 NSP9 基因片段和 pET-28a 载体质粒, 进行酶切与连接。取连接产物转化至大肠杆菌 DH5 α 中, 挑取单个菌落进行 PCR 鉴定 (图 2), 根据 PCR 结果选取阳性菌落扩大培养, 并提取其质粒, 送往上海生工 Sangon Biotech 公司测序, 将测序正确的阳性质粒命名为 pET-28a-NSP9。

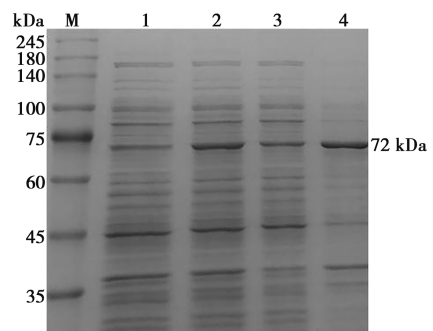


M. DNA Marker; 1~15. 挑取不同单个菌落; 16. 阳性对照; 17. 阴性对照。

图 2 重组载体 PCR 鉴定

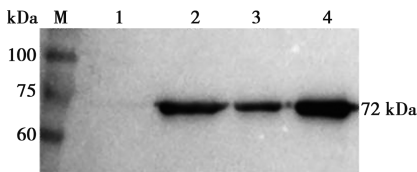
2.3 NSP9 重组蛋白表达

取质粒 pET-28a-NSP9 转化至 BL21 感受态细胞中, 在 IPTG 终浓度 0.2 mmol/L、37 ℃ 诱导 4 h 条件下培养, 收集菌体, 冰上超声破碎, 分离上清液与沉淀。在未诱导、诱导后全菌蛋白、超声后上清液、超声后沉淀共 4 个蛋白样品中, 分别加入 SDS Loading Buffer 混匀, 金属浴 10 min, 将蛋白样品置于冰上迅速冷却后, 进行 SDS-PAGE (图 3) 和 Western blot (图 4) 鉴定分析。结果显示, NSP9 重组蛋白 (72 kDa) 成功表达, 未诱导 72 kDa 处条带为菌体蛋白, 但 NSP9 蛋白超声后上清液目的蛋白含量较少, 主要以包涵体形式在超声后沉淀中存在, 且具有良好的反应原性。



M. 蛋白 Marker; 1. 未诱导; 2. 诱导后全菌蛋白; 3. 超声后上清液; 4. 超声后沉淀。

图 3 NSP9 重组蛋白 SDS-PAGE 结果



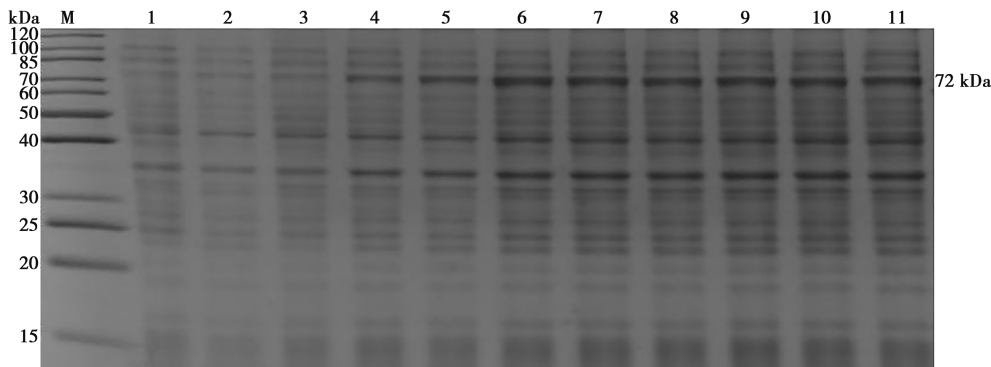
M. 蛋白 Marker; 1. 未诱导; 2. 诱导后全菌蛋白; 3. 超声后上清液; 4. 超声后沉淀。

图 4 NSP9 重组蛋白 Western blot 鉴定

2.4 表达条件优化

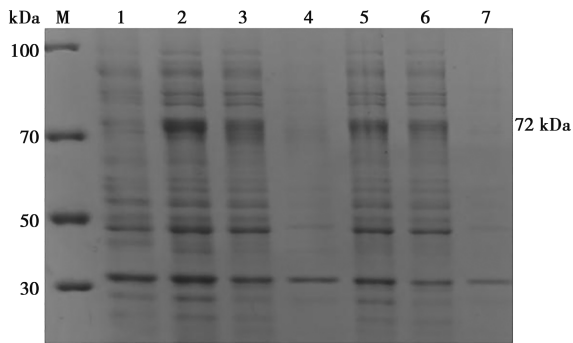
通过降低诱导温度至 16 ℃，延长表达时间至

36 h，每 4 h 取一次样，来优化蛋白表达形式，经 SDS-PAGE 结果显示（图 5），诱导 16~36 h 有较明显条带。然后选取诱导 24 和 32 h，通过超声破碎分离上清液与沉淀，经 SDS-PAGE 结果显示（图 6），24 和 32 h 都以可溶性表达为主，32 h 上清液含量高于 24 h。因此，在 IPTG 终浓度为 0.2 mmol/L，16 ℃ 诱导 32 h 的条件下，重组蛋白 NSP9 主要以可溶性的形式在超声上清液中存在，并根据此条件进行大量表达。



M. 蛋白 Marker; 1. 空载体; 2. IPTG 诱导前; 3~11. 诱导 4、8、12、16、20、24、28、32、36 h 全菌蛋白。

图 5 不同诱导时间 NSP9 蛋白表达的 SDS-PAGE 分析

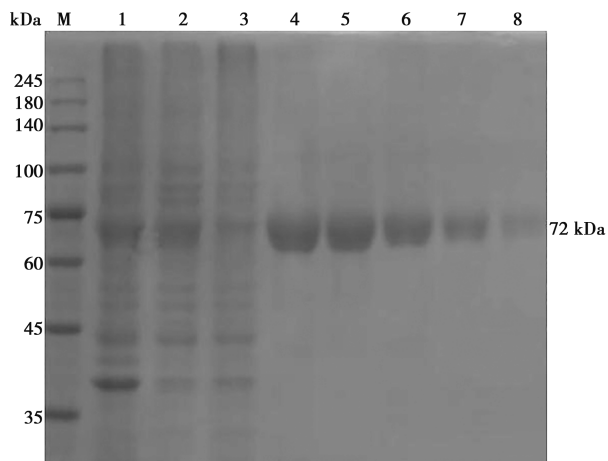


M. 蛋白 Marker; 1. 空载体; 2. 32 h 全菌蛋白; 3. 32 h 超声上清液; 4. 32 h 超声沉淀; 5. 24 h 全菌蛋白; 6. 24 h 超声上清液; 7. 24 h 超声沉淀。

图 6 NSP9 蛋白可溶性表达的 SDS-PAGE 分析

2.5 NSP9 蛋白纯化

收集经上述条件大量表达的细菌，超声破碎后，通过镍柱亲和层析进行纯化，经 SDS-PAGE 分析显示得到比较纯的 NSP9 蛋白（图 7）。

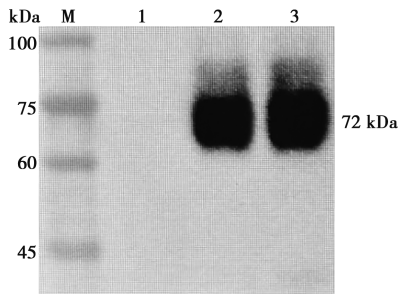


M. 蛋白 Marker; 1. 诱导后全菌蛋白; 2. 超声后上清液; 3. 流穿液; 4~8. 洗脱液 E1-E5。

图 7 蛋白纯化 SDS-PAGE 分析

2.6 NSP9 重组蛋白反应原性的鉴定

将纯化好的重组蛋白进行 Western blot 鉴定，在预期位置观察目的条带（图 8），证明目的条带被正确表达，重组蛋白具有良好的反应原性。



M. 蛋白 Marker; 1. 空载体; 2、3. 蛋白纯化洗脱液。

图8 蛋白纯化 Western blot 结果

2.7 间接 ELISA 测定多克隆抗体的效价

利用纯化的 NSP9 蛋白包被抗原建立间接 ELISA 方法测定多克隆抗体效价, 结果表明 (图 9), 抗 NSP 蛋白的多克隆抗体效价为 1 : 640 000 (3 只小鼠中最高效价)。

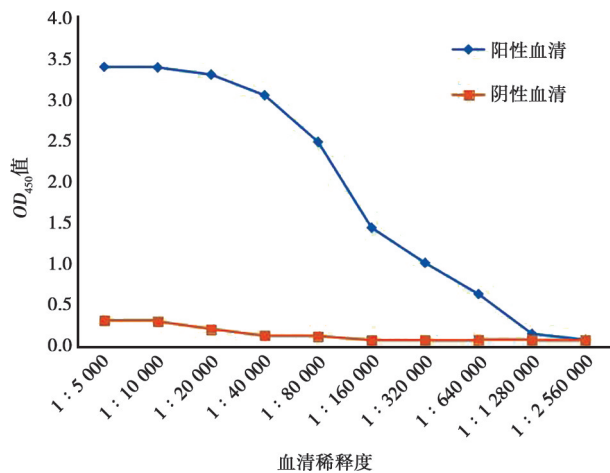


图9 间接 ELISA 测定多克隆抗体的效价

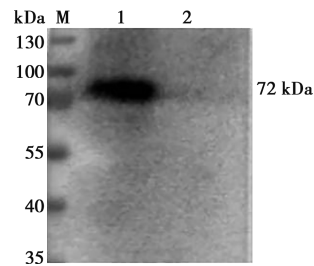
2.8 多克隆抗体的 Western blot 鉴定

用 PRRSV 感染细胞后的细胞裂解液制备蛋白样品, 同时以 PRRSV NSP9 蛋白作为抗原制备的多克隆抗体作为一抗进行 Western blot, 结果显示 (图 10), 在 72 kDa 大小处有明显条带, 说明制备的多克隆抗体具备特异性识别 NSP9 蛋白的能力。

3 讨论

本研究利用大肠杆菌原核表达系统, 获得可溶性非结构蛋白 NSP9, 经纯化后获得比较纯的 NSP9 蛋白, 将纯化后的 NSP9 蛋白免疫小鼠获得具有特异性的多克隆抗体。虽然真核表达蛋白系统对翻译后的蛋白有完整的加工修饰系统, 使其表达蛋白具有生物活性, 但具有生产成本高、周期长、产量低等缺点, 而以大肠杆菌为代表的原核表达蛋白系统具有生产成本

低、周期短、产量高等优点^[13]。即使原核系统表达外源蛋白, 但往往是以包涵体形式存在^[14]。黄志强^[15]克隆表达纯化 NSP9 蛋白时, 重组蛋白主要以包涵体形式存在, 通过变性、复性得到了纯化蛋白, 但我们通过优化诱导条件, 成功获得具有生物活性的可溶性蛋白。在诱导表达过程中, 发现温度和诱导时间是影响该蛋白是否可溶性表达的关键因素, 在 IPTG 终浓度 0.2 mmol/L、37 °C 诱导 4 h 条件下, NSP9 蛋白主要以包涵体形式存在。降低诱导温度, 细菌代谢将会变缓, 部分分子伴侣的表达与活力也会增加, 有助于形成具有生物活性的可溶性蛋白^[16]。随着诱导温度的下降和诱导时间的延长, 该蛋白表达形式发生明显变化, 在 IPTG 终浓度 0.2 mmol/L、16 °C 诱导 32 h 条件下, NSP9 蛋白主要以可溶性表达的形式在超声上清液中存在。IPTG 的终浓度大小, 很大程度上也影响着蛋白表达含量, 但并不是浓度越高, 诱导蛋白表达量就越多, 过量的 IPTG 也会影响蛋白表达效率。IPTG 在发挥作用时, 自身并不会被分解, 通过 IPTG 用量报道以及自身试验经验, 发现 0.2 mmol/L 终浓度的 IPTG, 足够本试验蛋白正常表达。



M. 蛋白 Marker; 1. 经 PRRSV 感染的 MARC-145 细胞; 2. 未经 PRRSV 感染的 MARC-145 细胞。

图10 多克隆抗体 Western blot 结果

此次纯化选用亲和的 His 标签, 该标签体积小、免疫原性低, 通常不会影响重组蛋白的结构与功能^[17]。固定化金属亲和层析 (IMAC) 技术可通过组氨酸残基与 Ni²⁺ 等金属离子之间的螯合作用来分离纯化 His 标记蛋白^[18]。使用镍柱亲和层析法纯化蛋白的过程中, 温度是纯化成功与否的关键因素, 在任何过程中都应尽量保持低温进行, 能有效提高蛋白稳定性。获得高浓度纯化蛋白时, 应立即使用或者正确保存起来, 因为高浓度下, 很容易形成白色絮状物析出。同时又因为洗脱液中含有咪唑, 致使得到的纯化蛋白含有咪唑, 在使用该蛋白前应与咪唑分离, 可通过沉淀法、色谱法、电泳法和膜分离法等方法分离溶剂^[19], 所以纯化完的蛋白处理同样关乎着蛋白纯化

的成功与否。虽然设计引物时也插入了 Flag 标签,但是经 His 标签纯化后获得了较纯的蛋白,因此没有使用 Flag 标签进一步纯化。

多克隆抗体具有制备方法简单,成本低,容易保存与使用,而且检测灵敏度高,抗原表位丰富,可与众多抗原结合^[20]。马晓莉等^[21]、赵孟孟等^[22],应用截取 NSP9 基因保守片段克隆表达,制备了 NSP9 抗体,而本试验扩增了 NSP9 全长基因,表位更加全面,NSP9 实现可溶性表达,因此获得了高性能的多克隆抗体。本研究获得的鼠源 NSP9 蛋白多克隆抗体,经间接 ELISA 和 Western blot 验证,具有很强的特异性,该多克隆抗体可为病毒检测、诊断等提供工具材料。

目前,国内外防控该病主要依靠弱毒活疫苗。然而,活疫苗仍存在潜在的安全性风险,同时导致 PRRSV 更多的遗传变异^[23]。PRRSV 复制特点导致的遗传多样性是造成 PRRS 难以防控的根本原因。深入研究 PRRSV 复制机制是彻底解决 PRRS 发生的根本所在,同时还可可为研制高效广谱的新药提供理论基础。PRRSV 非结构蛋白在病毒复制过程中发挥重要作用,非结构蛋白 NSP9 及其抗体的制备研究也可为深入揭示病毒复制机制奠定基础。

参考文献:

- [1] LUNNEY J K, FANG Y, LADINIG A, et al. Porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV): pathogenesis and interaction with the immune system [J]. *Annu Rev Anim Biosci*, 2016, 4: 129-154.
- [2] BLOEMRAAD M, DE KLUIJVER E P, PETERSEN A, et al. Porcine reproductive and respiratory syndrome: temperature and pH stability of lelystad virus and its survival in tissue specimens from viraemic pigs [J]. *Vet Microbiol*, 1994, 42 (4): 361-371.
- [3] MEULENBERG J J M. PRRSV, the virus [J]. *Vet Res*, 2000, 31 (1): 11-21.
- [4] KHATUN A, SHABIR N, SEO B J, et al. The attenuation phenotype of a ribavirin - resistant porcine reproductive and respiratory syndrome virus is maintained during sequential passages in pigs [J]. *J Virol*, 2016, 90 (9): 4454-4468.
- [5] WANG Y, LI R, QIAO S, et al. Structural characterization of non-structural protein 9 complexed with specific nanobody pinpoints two important residues involved in porcine reproductive and respiratory syndrome virus replication [J]. *Front Microbiol*, 2020, 11: 581856.
- [6] BEERENS N, SELISKO B, RICAGNO S, et al. *De novo* initiation of RNA synthesis by the arterivirus RNA - dependent RNA polymerase [J]. *J Virol*, 2007, 81 (16): 8384-8395.
- [7] ZHAO M, NING Z, WANG H, et al. Sequence analysis of NSP9 gene of 25 PRRSV strains from Guangdong province, subtropical southern China [J]. *Virus Genes*, 2013, 46: 88-96.
- [8] MURTAUGH M P, STADEJEK T, ABRAHANTE J E, et al. The ever-expanding diversity of porcine reproductive and respiratory syndrome virus [J]. *Virus Res*, 2010, 154 (1/2): 18-30.
- [9] HANADA K, SUZUKI Y, NAKANE T, et al. The origin and evolution of porcine reproductive and respiratory syndrome viruses [J]. *Mol Biol Evol*, 2005, 22 (4): 1024-1031.
- [10] 李妍. Nsp9-Nsp12 与高致病性 PRRSV 的增殖能力和致死性毒力的相关性 [D]. 北京: 中国农业大学, 2014.
- [11] 董建国. 猪繁殖与呼吸综合征病毒 Nsp9 与宿主细胞蛋白 pRb 相互作用的分子机制 [D]. 北京: 中国农业大学, 2014.
- [12] 邹伟斌, 陈坚, 穆光慧, 等. 猪繁殖与呼吸综合征病毒非结构蛋白 9 研究进展 [J]. *现代畜牧兽医*, 2020 (8): 51-54.
- [13] 张磊, 唐永凯, 李红霞, 等. 促进原核表达蛋白可溶性的研究进展 [J]. *中国生物工程杂志*, 2021, 41 (S1): 138-149.
- [14] YIN J, LI G, REN X, et al. Select what you need: a comparative evaluation of the advantages and limitations of frequently used expression systems for foreign genes [J]. *J Biotechnol*, 2007, 127 (3): 335-347.
- [15] 黄志强. PRRSV Nsp9 基因单克隆抗体及阻断 ELISA 检测试剂盒的制备 [D]. 长春: 吉林大学, 2012.
- [16] SØRENSEN H P, MORTENSEN K K. Soluble expression of recombinant proteins in the cytoplasm of *Escherichia coli* [J]. *Microb Cell Fact*, 2005, 4 (1): 1.
- [17] SPRIESTERSBACH A, KUBICEK J, SCHÄFER F, et al. Purification of his - tagged proteins [J]. *Methods Enzymol*, 2015, 559: 1-15.
- [18] KIELKOPF C L, BAUER W, URBATSCH I L. Purification of poly-histidine-tagged proteins by immobilized metal affinity chromatography [J]. *Cold Spring Harb Protoc*, 2020 (6): 102194.
- [19] 付文鹏, 杨永寿, 肖培云. 动物源活性蛋白多肽的分离纯化方法研究进展 [J]. *天然产物研究与开发*, 2019, 31 (5): 916-921.
- [20] ASCOLI C A, AGGELER B. Overlooked benefits of using polyclonal antibodies [J]. *Biotechniques*, 2018, 65 (3): 127-136.
- [21] 马晓莉, 夏兆伦, 余文兰, 等. 猪繁殖与呼吸综合征病毒 Nsp9 蛋白多克隆抗体的制备及其中和活性研究 [J]. *黑龙江畜牧兽医*, 2020 (11): 92-95.
- [22] 赵孟孟, 张二芹, 冯松林, 等. 猪繁殖与呼吸综合征病毒 NSP9 蛋白单克隆抗体制备与鉴定 [J]. *东北农业大学学报*, 2016, 47 (7): 63-69.
- [23] GUO Z, CHEN X X, LI R, et al. The prevalent status and genetic diversity of porcine reproductive and respiratory syndrome virus in China: a molecular epidemiological perspective [J]. *Virol J*, 2018, 15 (1): 2.