

PRRSV 重组非结构蛋白 NSP1 表达及免疫效果评价

王文星¹, 李红欢¹, 顾晓晓¹, 刘紫薇¹, 吴澳迪¹, 徐明国¹, 马忠臣^{1,2,3*},
陈创夫^{1,2,3*}

1 石河子大学 动物科技学院, 新疆 石河子

2 石河子大学, 绵羊健康养殖与人兽共患病防控协同创新中心, 新疆 石河子

3 石河子大学, 动物健康养殖国际联合研究中心, 新疆 石河子

王文星, 李红欢, 顾晓晓, 刘紫薇, 吴澳迪, 徐明国, 马忠臣, 陈创夫. PRRSV 重组非结构蛋白 NSP1 表达及免疫效果评价[J]. 微生物学报, 2025, 65(5): 2267-2279.

WANG Wenxing, LI Honghuan, GU Xiaoxiao, LIU Ziwei, WU Aodi, XU Mingguo, MA Zhongchen, CHEN Chuangfu. Prokaryotic expression and immune effect evaluation of PRRSV nonstructural protein NSP1[J]. *Acta Microbiologica Sinica*, 2025, 65(5): 2267-2279.

摘要: 【目的】表达并获取猪繁殖与呼吸综合征病毒(porcine reproductive and respiratory syndrome virus, PRRSV) NADC 30 毒株的重组非结构蛋白 NSP1, 评估其在小鼠体内的免疫效果, 并探究 PRRSV 非结构蛋白作为疫苗抗原的潜在应用价值。【方法】利用原核表达系统表达 PRRSV NADC30 毒株的 NSP1 蛋白, 纯化后通过 Western blotting 验证 NSP1 的体外表达及其抗体反应性; 将纯化后的重组 NSP1 蛋白免疫小鼠, 测定其在小鼠体内诱导的细胞免疫和体液免疫水平; 通过病毒中和试验评价重组蛋白 NSP1 诱导的中和抗体水平。【结果】将 NSP1 目的基因连接至大肠杆菌 pET-28a 载体并进行原核表达, Western blotting 结果显示, 重组非结构蛋白 NSP1 能够正确表达, 并且具有抗体反应性。经鉴定正确的重组蛋白 NSP1 免疫小鼠后, 能够提高小鼠脾淋巴细胞中 IFN- γ 和 TNF- α 的表达水平, 刺激机体产生细胞免疫应答。同时, 重组蛋白 NSP1 还能够显著增强小鼠脾淋巴细胞的增殖能力。ELISA 检测结果显示, 免疫小鼠血清中的特异性抗体水平升高, 进一步分析特异性抗体亚型(IgG2a 和 IgG1)发现, 重组蛋白 NSP1 刺激机体产生的免疫类型偏向于 Th2 型体液免疫; 病毒中和试验表明, 重组蛋白 NSP1 具有良好的病毒中和能力, 在免疫后 28 d 时中和效价为 1:37, 42 d 时中和效价为 1:31, 均显著高于 PBS 对照组, 与商品化疫苗组无差异。【结论】PRRSV 重组非结构蛋白 NSP1 免疫小鼠后能够刺激机体产生细胞免疫应答与体液免疫应答, 并且具有良好的病毒中和能力, 为新型 PRRSV 疫苗的开发提供了潜在的新思路。

资助项目: 河北省重点研发计划(21322912D); 新疆维吾尔自治区“天池英才(青年博士)”计划

This work was supported by the Key Research and Development Program of Hebei Province (21322912D) and the Program “Tianchi Talent (Young Doctor)” in Xinjiang Uygur Autonomous Region.

*Corresponding authors. E-mail: MA Zhongchen, zhongchen_ma@163.com; CHEN Chuangfu, ccf-xb@163.com

Received: 2024-11-08; Accepted: 2025-01-21; Published online: 2025-03-11

关键词：猪繁殖与呼吸综合征病毒；重组蛋白 NSP1；免疫评价；疫苗

Prokaryotic expression and immune effect evaluation of PRRSV nonstructural protein NSP1

WANG Wenxing¹, LI Honghuan¹, GU Xiaoxiao¹, LIU Ziwei¹, WU Aodi¹, XU Mingguo¹,
MA Zhongchen^{1,2,3*}, CHEN Chuangfu^{1,2,3*}

1 College of Animal Science and Technology, Shihezi University, Shihezi, Xinjiang, China

2 Collaborative Innovation Center for Sheep Health Breeding and Zoonotic Disease Prevention and Control,
Shihezi University, Shihezi, Xinjiang, China

3 International Joint Research Center for Animal Health, Shihezi University, Shihezi, Xinjiang, China

Abstract: [Objective] To express the recombinant nonstructural protein NSP1 of the porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) strain NADC 30, evaluate its immune effect in mice, and explore the potential value of the nonstructural proteins of PRRSV as vaccine antigens. [Methods] The prokaryotic expression system was used to express NSP1 of NADC30. After purification, the expression and antibody reactivity of NSP1 *in vitro* were identified by Western blotting. After mice were immunized with NSP1, the levels of cellular and humoral immunity induced by NSP1 were measured. The level of neutralizing antibody induced by NSP1 was evaluated by the virus neutralization assay. [Results] The target gene of NSP1 was connected to the *Escherichia coli* pET-28a vector for prokaryotic expression. Western blotting identified that the recombinant protein NSP1 was correctly expressed and had antibody reactivity. After mice were immunized with the confirmed recombinant protein NSP1, the levels of interferon (IFN)- γ and tumor necrosis factor (TNF)- α in the spleen lymphocytes of mice were elevated, and cellular immunity was stimulated. At the same time, the recombinant protein NSP1 significantly improved the proliferation of spleen lymphocytes in mice. ELISA results suggested that the level of specific antibodies in the serum rose after immunization. Further analysis of the specific antibody subtypes (IgG2a and IgG1) produced showed that the type of immunity stimulated by recombinant NSP1 was biased to Th2 humoral immunity. In addition, the virus neutralization assay showed that the recombinant protein NSP1 had a good virus neutralization ability, with the neutralization titer of 1:37 on day 28 and 1:31 on day 42, which were significantly higher than those of the PBS control group and had no difference from those of the commercial vaccine group. [Conclusion] The recombinant nonstructural protein NSP1 of PRRSV can stimulate cellular and humoral immunity in mice and has a good virus neutralization ability, which provides a new idea for the development of next-generation PRRSV vaccines.

Keywords: porcine reproductive and respiratory syndrome virus; recombinant protein NSP1; immune evaluation; vaccine

猪繁殖与呼吸综合征病毒(porcine reproductive and respiratory syndrome virus, PRRSV)感染会引发猪繁殖与呼吸综合征(porcine reproductive and respiratory syndrome, PRRS), 俗称猪“蓝耳病”, 是全球常见的猪病之一, 其临床特征主要表现为妊娠母猪流产, 产死胎、木乃伊胎, 以及仔猪呼吸综合征等, 给全球养猪业带来了巨大的经济损失。PRRSV 的持续重组和突变使其演化出多种机制来规避宿主的天然免疫反应^[1], 破坏宿主防御系统, 从而为其自身生存提供有利条件。自 1996 年在中国首次发现 PRRSV 以来, 已经出现了多种遗传差异显著的 PRRSV 毒株, 这使得疾病的预防和控制变得更加复杂^[2]。PRRSV NADC 30-Like 是国内近年来逐渐流行的新毒株, 它与美国的 NADC30 毒株高度同源, 被认为是由 NADC30 毒株变异演化而来。

PRRSV 病毒的基因组全长约 15 kb, 包含 10 个或至少 8 个开放阅读框(open reading frame, ORF)。其中, ORF2-ORF7 负责编码病毒的结构蛋白(N、M、GP2-GP5 和 E), 而 PRRSV 的复制酶基因由 ORF1a 和 ORF1b 组成, 复制酶基因占据了整个病毒基因组约 3/4 的长度, 这 2 个区域分别编码了 2 个复制酶相关的多蛋白 pp1a 和 pp1ab, 这些多蛋白经过加工后会形成 15 种非结构蛋白(nonstructural proteins, NSPs), 这些蛋白对于病毒 RNA 的合成以及对抗宿主的抗病毒免疫反应至关重要^[3-6]。NSP1 是一个多功能蛋白, 包含 2 个木瓜样半胱氨酸蛋白酶(PCP α 和 PCP β)以及 1 个锌指结构基序^[7]。PCP α 和 PCP β 分别负责 NSP1 α 和 NSP1 β 的自我蛋白水解释放^[8]。NSP1 α 和 NSP1 β 这 2 个亚基均定位于细胞核中, 这暗示它们可能具有调节细胞功能的潜力^[9]。NSP1 能够被宿主免疫系统识别, 并触发具有中和能力的抗体反应^[10]。NSP1 蛋白含有高度抗原区域, 并且在不同的 PRRSV 毒株中展现出良好的保守性^[11]。Johnson 等^[12]研究表明, NSP1 能够诱导疫苗和野外分离物产生强大且快速的交叉抗体反应。这些研究结果表明, NSP1

可能是 PRRSV 主要的交叉反应抗原, 提示针对 NSP1 的免疫应答在抗 PRRSV 感染中发挥着关键作用。然而, 在国内关于 NSP1 作为亚单位疫苗抗原的免疫效果尚未见报道。

目前, 尚未研制出有效的 PRRSV 疫苗。尽管已经尝试了 DNA 疫苗、亚单位疫苗和病毒载体疫苗, 但它们作为改良活病毒(modified live virus, MLV)疫苗的替代品, 其潜力尚不确定^[13]。已经证实, PRRSV NSPs 在调节宿主对 PRRSV 感染的先天免疫应答中扮演了多种角色^[9]。NSPs 在病毒粒子结构蛋白的加工和成熟中起到了关键作用, 因此, 针对 PRRSV NSPs 的早期和持久的免疫反应可能是实现有效控制 PRRSV 感染的关键。本研究通过原核表达系统表达、纯化了 PRRSV NSP1 重组蛋白, 并对该重组蛋白在小鼠体内的免疫效果进行了初步评价, 旨在为新型 PRRSV 疫苗的开发提供数据支持。

1 材料与方法

1.1 病毒、细胞和实验动物

PRRSV XJSW-2021 株(GenBank 登录号为 OR247780.1)和 Marc-145 细胞由本实验室保存。SPF 级 6 周龄 BALB/c 小鼠购自河南省实验动物中心。动物实验经石河子大学生物伦理委员会批准(审批号: A2023-246)。

1.2 主要试剂

小鼠 ELISA IL-10 试剂盒, Valukine 公司; 小鼠 Elispot IFN- γ 试剂盒, Mabtech 公司; 小鼠脾脏淋巴细胞分离试剂盒, 天津市灏洋生物制品科技有限责任公司; RNA 提取试剂盒, 北京全式金生物技术股份有限公司; 反转录试剂盒, 江苏康为世纪生物科技股份有限公司; HRP 标记的羊抗鼠特异性抗体 IgG、IgG1、IgG2a, 武汉三鹰生物技术有限公司; Pierce BCA 蛋白检测试剂盒, 赛默飞世尔科技公司; 质粒小量提取试剂盒和 CCK8 试剂盒, 北京索莱宝科技有限公司; PRRSV 抗体阳性血清由本实验室保存。

1.3 NSP1 蛋白的结构预测

根据 NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) 的 PRRSV NADC30 毒株 NSP1 的氨基酸序列 (GenBank 登录号为 QBG05658.1) 用 PSIPRED Workbench v4.0 和 NPS@: SOPMA secondary structure prediction-NPSA-Lyon-France 进行蛋白二级结构预测, 再利用 Untitled Project|Modelsy 与 <https://zhanggroup.org/D-I-TASSER/> 构建蛋白三级结构模型。利用 PyMOL 软件对 NSP1 α 与 NSP1 β 进行分子对接模拟。

1.4 重组质粒的合成

对 NSP1 的基因序列进行密码子优化, 并在基因上游和下游分别加入 *Bam*H I 和 *Xho* I 酶切位点, 将目的基因与大肠杆菌 pET-28a 载体进行连接。重组质粒由北京擎科生物科技股份有限公司合成。

1.5 重组质粒的酶切鉴定

将合成的 NSP1 重组质粒进行双酶切鉴定, 酶切体系: 质粒 10 μ L, ddH₂O 6 μ L, Buffer 2 μ L, 酶(浓度为 50 U/ μ L)各 1 μ L, 37 $^{\circ}$ C 水浴酶切 4 h。酶切产物用 1% 琼脂糖凝胶进行电泳。对酶切正确的质粒进行胶回收后送杭州有康生物科技有限公司测序。

1.6 重组蛋白的原核表达与纯化

1.6.1 重组质粒的转化

将鉴定正确的重组质粒通过热激法转化 BL21(DE3)感受态细胞。将转化产物涂布于含有硫酸卡那霉素(K⁺)抗性的 LB 固体培养基上, 于 37 $^{\circ}$ C 恒温培养箱中培养过夜。第 2 天挑取单菌落 37 $^{\circ}$ C、170 r/min 振荡培养 12 h。将培养好的菌液按菌液与 50% 甘油 1:1 的比例保存于甘油管中, 置于 -20 $^{\circ}$ C 冰箱冻存。

1.6.2 重组蛋白表达条件的优化

将菌液分别置于 37 $^{\circ}$ C、170 r/min 摇床上诱导 0、2、4、6 h 时, 分别收集 1 mL 菌液沉淀; 16 $^{\circ}$ C、170 r/min 摇床上进行低温诱导 12 h 时收集 1 mL 菌液沉淀, 菌液沉淀进行 SDS-

PAGE 电泳, 确定最佳诱导时间和最佳诱导温度。

1.6.3 重组蛋白的纯化

根据重组蛋白的最佳诱导条件进行大量表达。收集菌液沉淀进行超声破碎(功率 35 W, 冰浴, 工作 5 s, 停 5 s, 超声 30 min)。破碎后 8 000 r/min 离心 30 min 后收集上清与沉淀, 通过 SDS-PAGE 确定重组蛋白的表达形式后, 利用镍柱对蛋白进行纯化。纯化后的蛋白装入透析袋进行梯度透析, 并检测蛋白浓度。纯化后的蛋白置于 -20 $^{\circ}$ C 冰箱保存。

1.7 重组蛋白的鉴定

将重组蛋白进行 SDS-PAGE, 电泳结束后进行转膜。转膜结束后, 使用 5% 脱脂奶粉封闭液在 4 $^{\circ}$ C 过夜封闭。随后在室温下水平摇床 90 r/min 孵育一抗 2 h, 洗膜 5 次, 室温摇床 90 r/min 孵育二抗 1 h, 洗膜 5 次。在暗室中, 膜上滴加显影液进行显影。

1.8 小鼠免疫试验

将纯化好的蛋白按照表 1 免疫方案进行免疫。免疫方式为小鼠背部皮下多点注射, 免疫前对小鼠进行断尾采血作为免疫前阴性对照, 免疫后每 7 d 进行断尾采血。商品化灭活疫苗兰立定(经典毒株 CH-1a)作为疫苗组对照。

1.8.1 特异性抗体水平

提前用小鼠 28 d 血清进行棋盘法筛选间接 ELISA 测定特异性抗体的反应条件。按照筛选条件分别进行过夜包被蛋白、5% 脱脂奶粉封闭、一抗孵育、二抗孵育、显色、终止。终止显色 5 min 内用酶标仪测量 OD₄₅₀ 处的吸光度值。

1.8.2 脾脏淋巴细胞 IFN- γ 分泌水平

在首次免疫小鼠后的第 28 天和第 42 天, 无菌分离小鼠的脾脏淋巴细胞。将分离出的脾脏淋巴细胞以每孔 1×10^6 个细胞的密度接种到预先包被有 IFN- γ 的 96 孔板上, 随后进行刺激并置于细胞培养箱中培养 48 h。之后弃去培养液,

表1 小鼠免疫计划及分组情况

Table 1 Immunization schedule and grouping of mice

组别 Group	数目 Number	疫苗 Vaccine	免疫剂量 Immune dose	免疫次数 Immune frequency	免疫周期 Immune cycle
1	12	NSP1	50 µg+50 µL	2	0 d, 14 d
2	12	PBS	100 µL	2	0 d, 14 d
3	12	Vaccines	100 µL	2	0 d, 14 d

对板进行 5 次洗涤。按照 Elispot IFN- γ 试剂盒的说明书进行操作, 加入检测抗体并室温孵育 2 h, 再次洗涤 5 次。加入链霉亲和素并室温孵育 1 h, 再次洗涤 5 次。加入过滤后的底物溶液进行斑点显色, 使用大量自来水冲洗以终止显色反应。最后, 将平板晾干, 并用铝箔包裹后送北京达科为生物技术有限公司进行读板。

1.8.3 脾脏淋巴细胞增殖

将淋巴细胞按照每孔 1×10^5 个细胞铺在 96 孔板上, 进行抗原刺激后置于细胞培养箱中培养。加入 CCK 溶液 4 h 后用酶标仪读取 OD_{450} 处的吸光度值, 计算刺激指数(stimulus index, SI)如公式(1)所示。

$$SI \text{ 刺激指数} = (\text{刺激原刺激孔} - \text{无刺激对照孔}) / (\text{非特异性刺激原刺激孔} - \text{无刺激对照孔}) \quad (1)$$

1.8.4 脾脏淋巴细胞中细胞因子 mRNA 的表达水平

将分离的脾淋巴细胞铺在 24 孔细胞培养板上, 每种细胞因子设置抗原刺激组和未刺激组对照, 抗原刺激后 24 孔板于细胞培养箱培养 24 h 后收样, 提取 RNA, 测浓度后反转录为 cDNA, 将 cDNA 作为模板进行荧光定量 PCR 检测各细胞因子 mRNA 水平的表达。

1.8.5 小鼠血清中 IL-10 的表达水平

用商品化的小鼠 IL-10 ELISA 试剂盒测定小鼠血清中的 IL-10 表达量, 按照试剂盒说明书操作, 利用标准品制作标准曲线, 然后计算样品吸光度值对应的 IL-10 表达量。

1.8.6 中和抗体水平

预先测定病毒(毒株为 PRRSV XJSW-2021)

的 $TCID_{50}$, 大量培养 Marc-145 细胞。将收集的 28 d 与 42 d 小鼠血清 56°C 水浴 30 min 热灭活, 经倍比稀释的血清与病毒相互作用 2 h (接毒量为 $200 TCID_{50}$), 平移至 96 孔细胞培养板上, 与细胞作用 1 h 后换成含 1% 胎牛血清的 DMEM 维持液, 连续 1 周观察细胞病变, 以能保护 50% 细胞不被病毒感染的判定为中和抗体阳性。采用 Reed-Muench 法计算中和抗体(neutralizing antibody, NA)滴度。

1.9 数据分析

试验数据采用 GraphPad Prism 9 软件进行双因素方差分析(two-way ANOVA), 采用 SD 检验法进行组间多重比较。 $P > 0.05$ 时, 视为差异无统计学意义(ns); $P < 0.05$ 为差异有统计学意义(*: $P < 0.05$; **: $P < 0.01$; ***: $P < 0.001$; ****: $P < 0.0001$)。

2 结果与分析

2.1 NSP1 蛋白的结构预测

通过 PSIPRED 和 SOPMA 在线工具对 NSP1 蛋白进行二级结构分析, 预测结果显示该蛋白包含 4 种二级结构: α 螺旋占整个蛋白的 20.60%, β 折叠占 5.76%, 无规则卷曲占 53.93%, 延伸链占 19.63% (图 1A、1B)。三级结构预测发现, NSP1 蛋白可在第 180 位氨基酸处自裂解, 形成 NSP1 α (图 1C) 和 NSP1 β (图 1E) 2 个亚基。NSP1 α 的三级结构模型拉什图评分为 91.00% (图 1D), NSP1 β 的三级结构模型的拉什图评分为 91.91% (图 1F), 表明所构建的三级结构模型是可信的[落在允许区(深色)与最大允许区(浅色)]

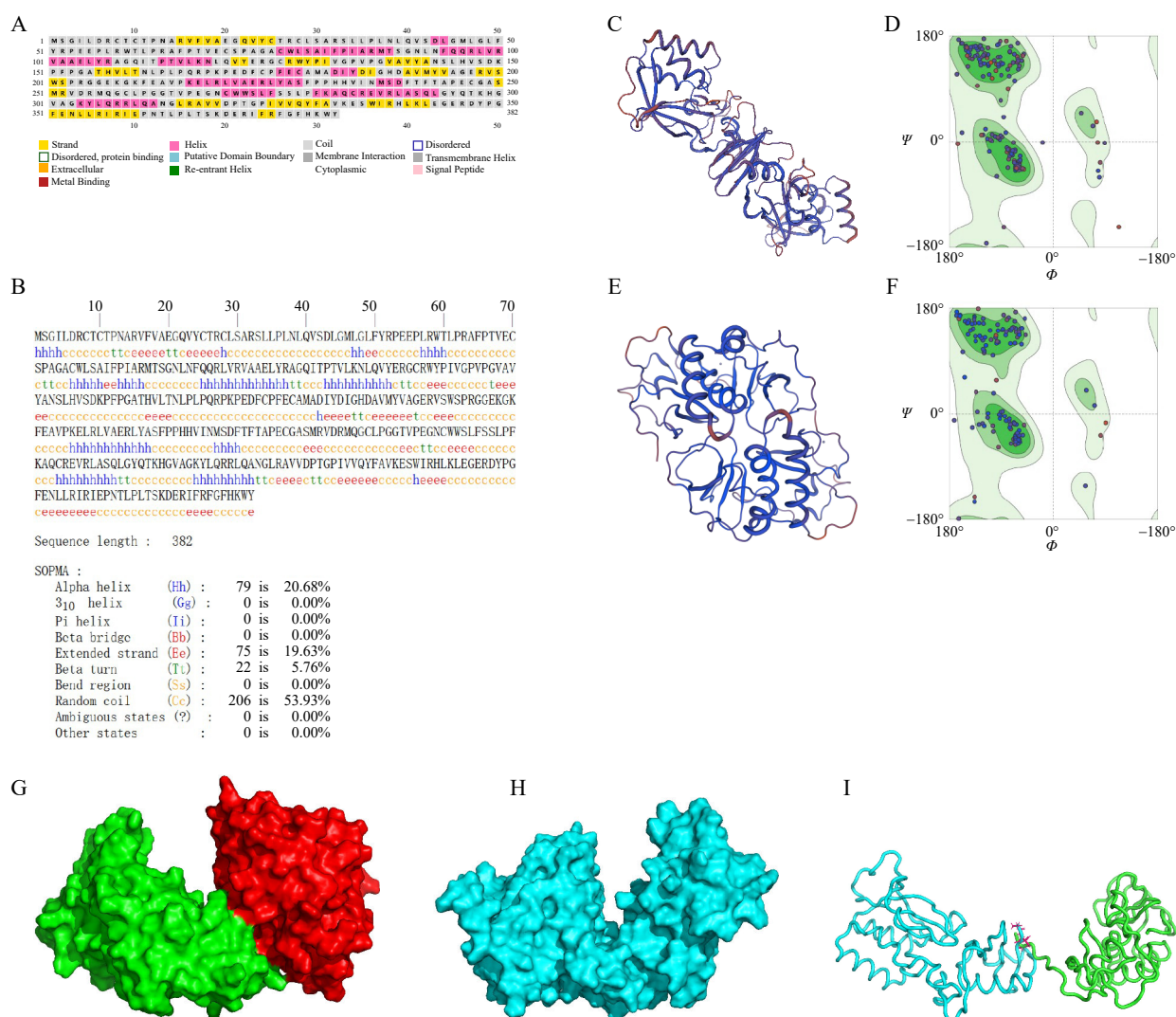


图1 NSP1蛋白的结构预测。 A: PSIPRED预测NSP1蛋白二级结构结果; B: SOPMA预测NSP1蛋白二级结构结果; C: NSP1 α 三级结构模型; D: NSP1 α 三级结构拉什图; E: NSP1 β 三级结构模型; F: NSP1 β 三级结构拉什图; G: NSP1两个单独亚基结合后的三级结构模型; H: 全蛋白氨基酸序列预测的三级结构模型; I: 分子对接模拟。

Figure 1 Structure prediction of NSP1 protein. A: NSP1 protein secondary structure prediction by PSIRPED; B: NSP1 protein secondary structure prediction by SOPMA; C: NSP1 α tertiary structure prediction; D: NSP1 α tertiary structure Rush diagram; E: NSP1 β tertiary structure prediction; F: NSP1 β tertiary structure rush diagram; G: Tertiary structure model of NSP1 after the combination of two separate subunits; H: Tertiary structure model of whole protein amino acid sequence prediction; I: Molecular docking simulation.

的氨基酸残基占整个蛋白质的比例高于 90.00% 则认为该模型的构象符合立体化学的规则]。使用 I-TASSER 对 NSP1 的 2 个亚基序列进行单独建模后连接,发现 2 个亚基结合后的结构(图 1G)

与基于全蛋白氨基酸序列预测的三级结构模型(图 1H)存在差异,通过 PyMOL 软件进行分子对接模拟(图 1I),发现 2 个亚基并非简单连接,而是在氢键作用下发生了氨基酸错位结合,这

种结合方式与结合位点的改变可能导致蛋白质功能的变化。

2.2 重组质粒的双酶切鉴定

将合成的 NSP1 重组质粒进行双酶切鉴定, 结果显示酶切后的质粒得到 2 条条带, 大小分别为 5 369 bp 和 1 158 bp, 与预期的目的条带大小相符(图 2)。对酶切鉴定正确的条带进行胶回收后送测序, 测序结果与目的基因比对匹配度为 100%, 表明已成功构建出正确的重组质粒。

2.3 重组蛋白 NSP1 的原核表达与纯化

通过 SDS-PAGE 分析了在不同诱导条件下获得的菌液沉淀。电泳结果显示, 重组蛋白 NSP1 在 37 °C 诱导 6 h 的表达量最高, 因此确定 37 °C 诱导 6 h 为重组蛋白 NSP1 的最佳诱导条件(图 3A)。在后续实验中以此条件进行了大量诱导表达。为了验证纯化后的重组蛋白 NSP1 在体外的正确表达及其抗体反应性, 进行了 Western blotting 实验。结果显示, 重组蛋白 NSP1 能够与 His 标签抗体(图 3B)以及 PRRS 阳性血清(图 3C)特异性结合, 并在约 42 kDa 处出现特异性条带, 这与预期的重组蛋白 NSP1 分子量相符。这表明重组蛋白 NSP1 不仅能在体外正确表

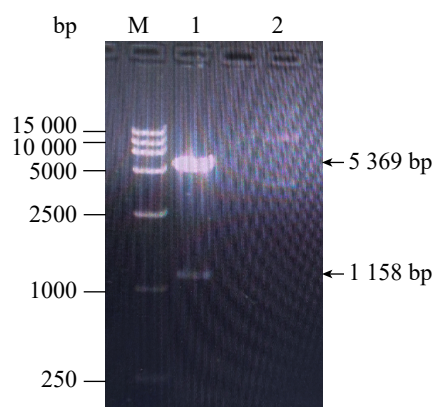


图2 重组质粒的双酶切鉴定。泳道M: 15 kb DNA marker; 泳道1: 双酶切质粒; 泳道2: 未酶切质粒。

Figure 2 Double digestion identification of recombinant plasmid. Lane M: 15 kb DNA marker; Lane 1: Double cut plasmid; Lane 2: Uncut plasmid.

达, 还具有良好的免疫原性。

2.4 安全性评价

连续记录小鼠每次免疫后 7 d 内的体重变化, 如图 4 所示, 小鼠在首次免疫后 7 d 内和二次免疫后 7 d 内均未出现体重下降现象, 整个免疫期间小鼠体重保持稳定, 且免疫后小鼠的

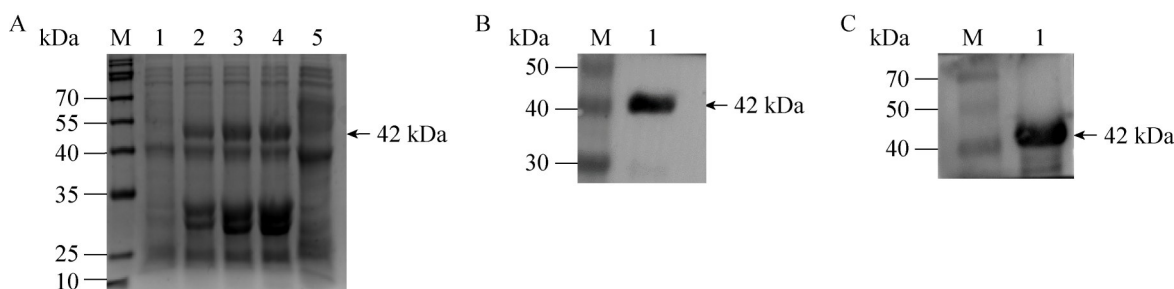


图3 重组蛋白NSP1的体外表达与免疫原性鉴定。A: 重组蛋白表达条件的优化(泳道1–4: 分别为37 °C诱导0、2、4、6 h收集的菌液沉淀; 泳道5: 16 °C诱导12 h收集的菌液沉淀); B: 重组蛋白NSP1与His标签抗体的反应; C: 重组蛋白NSP1与阳性血清的反应。

Figure 3 *In vitro* expression and immunogenicity identification of recombinant protein NSP1. A: Optimization of expression conditions of recombinant protein (lanes 1–4: The bacterial solution collected at 0 h, 2 h, 4 h and 6 h was induced by 37 °C, respectively; Lane 5: The bacterial solution collected at 12 h was induced by 16 °C; B: Reaction of recombinant protein NSP1 with His labeled antibody; C: Reaction of recombinant protein NSP1 with positive serum.

精神状态与饮食状况良好,无异常行为表现。

2.5 细胞免疫、体液免疫及偏向性评估

2.5.1 小鼠血清及脾淋巴细胞中细胞因子的表达水平

在首次免疫后第 28 天与第 42 天时分离小鼠的脾脏淋巴细胞,并通过实时荧光定量 PCR 检测脾脏淋巴细胞中细胞因子 mRNA 的表达水平。在第 28 天时,重组蛋白 NSP1 组和疫苗组均能显著地增加 IL-6 与 TNF- α 的表达,且重组蛋白 NSP1 组 IL-6 与 TNF- α 的表达量比疫苗组 IL-6 与 TNF- α 的表达量显著性增高($P<0.0001$)。然而,二者 IL-4 与 IL-10 的表达量与 PBS 对照组相比均无显著性差异($P>0.05$)。在 42 天时,同样观察到重组蛋白 NSP1 组能显著地增加 IL-6 与 TNF- α 的表达($P<0.0001$),而 IL-4 与 IL-10 的表达与 PBS 对照组相比无显著性差异($P>0.05$) (图 5A、5B)。使用 ELISA 试剂盒检测小鼠第 42 天血清中 IL-10 的表达量,根据标准品制作的标准曲线(图 5C),结果显示重组蛋白 NSP1 组和疫苗组血清中 IL-10 的表达量与 PBS 对照组相比均无显著性差异($P>0.05$) (图 5D)。

2.5.2 细胞免疫水平

为了进一步评估重组蛋白 NSP1 在小鼠体内引发的细胞免疫水平。在首次免疫小鼠后的第

28 天和第 42 天采用 Elispot 技术检测了小鼠脾脏淋巴细胞中 IFN- γ 的分泌情况。结果表明,重组蛋白 NSP1 在第 28 天就能显著地增加小鼠脾脏淋巴细胞分泌 IFN- γ 的细胞数量($P<0.05$),并且到第 42 天时差异性变得更加明显($P<0.0001$) (图 6A)。相比之下,疫苗组免疫小鼠后,在第 28 天时小鼠脾脏淋巴细胞分泌 IFN- γ 的水平与 PBS 对照组相比无显著性差异($P>0.05$) (图 6B),直到第 42 天时才观察到疫苗组显著地增加了小鼠脾脏淋巴细胞中 IFN- γ 的表达($P<0.0001$) (图 6C)。淋巴细胞增殖实验结果表明,在第 28 天时重组蛋白 NSP1 与疫苗组均显著地提高了淋巴细胞的增殖能力(图 6D)。上述结果表明,重组蛋白 NSP1 能够增强小鼠的细胞免疫水平。

2.5.3 体液免疫水平

通过间接 ELISA 技术检测特异性抗体水平,进一步评估重组蛋白 NSP1 在小鼠体内引发的体液免疫效果。结果表明,重组蛋白免疫小鼠后,引发的特异性抗体水平整体呈上升趋势,在第 21 天时特异性抗体水平开始有所升高,并持续升高至第 42 天,而疫苗组与 PBS 组在免疫后的整个周期内并未观察到明显的抗体水平变化(图 7A)。同时,检测了特异性抗体亚型 IgG1 与 IgG2a 的表达情况,观察到 IgG1 在首次免疫后

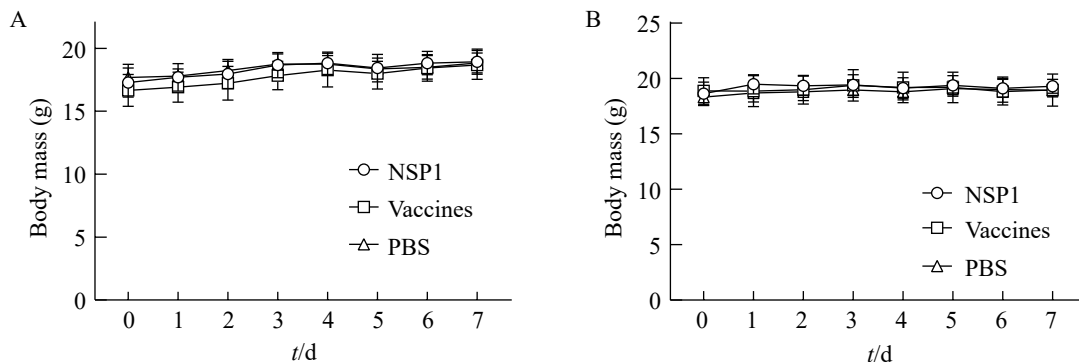


图4 免疫小鼠后的安全性评价。A: 小鼠首次免疫后7 d内体重变化; B: 小鼠二次免疫后7 d内体重变化。

Figure 4 Safety evaluation of mice after immunization. A: The weight change of mice within 7 days after first immunization; B: Changes of body weight in mice within 7 days after second immunization.

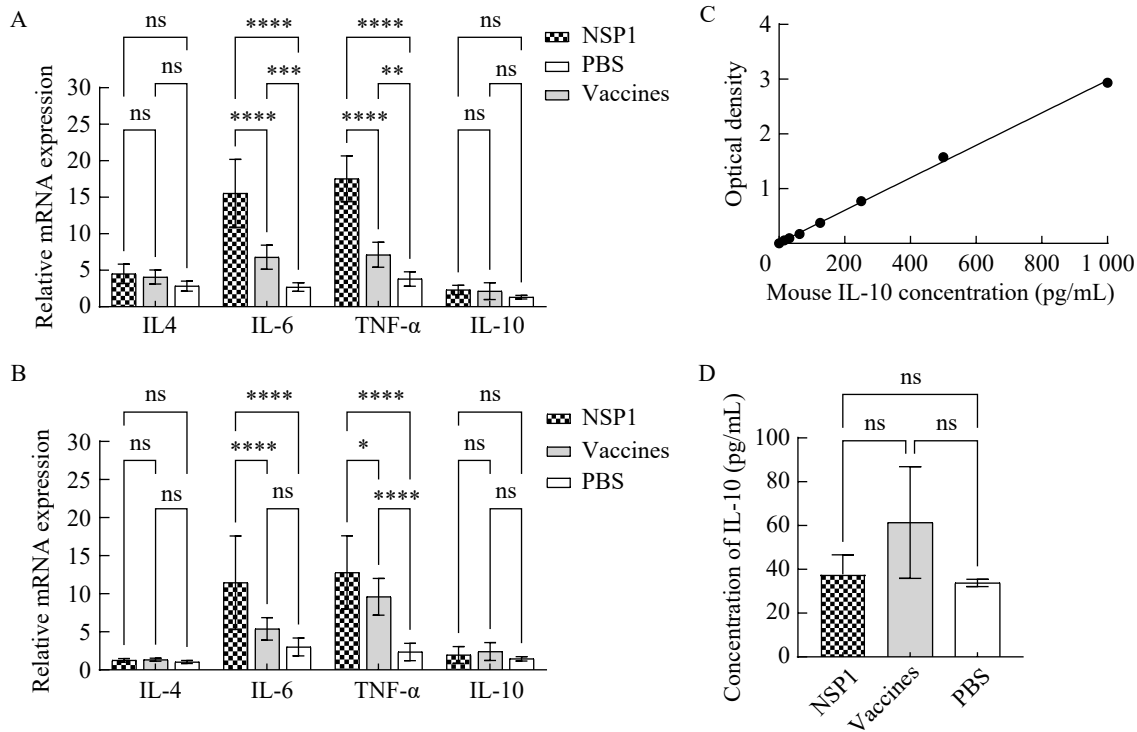


图5 小鼠血清及脾脏淋巴细胞中各细胞因子的表达。A: 28 d脾脏淋巴细胞中细胞因子mRNA水平的表达; B: 42 d脾脏淋巴细胞中细胞因子mRNA水平的表达; C: IL-10试剂盒标准品制作的标准曲线; D: 42 d时小鼠血清中IL-10表达水平。

Figure 5 Expression of cytokines in serum and spleen lymphocytes of mice. A: Expression of cytokine mRNA in spleen lymphocytes on day 28; B: Expression of cytokine mRNA level in spleen lymphocytes at day 42 standard curve of IL-10 kit standard product; D: Expression level of IL-10 in serum of mice at day 42. ns: $P > 0.05$; *: $P < 0.05$; **: $P < 0.01$; ***: $P < 0.001$; ****: $P < 0.0001$.

第21天开始呈现上升趋势,一直持续到第42天(图7B)。IgG2a在第35天时才开始上升(图7C)。特异性抗体的检测结果表明,重组蛋白NSP1能够在小鼠体内引发高水平的体液免疫。

2.5.4 免疫偏向性

为了确定重组蛋白在小鼠体内引起的免疫偏向性,进一步分析了小鼠血清中的特异性抗体亚型。结果发现,在免疫小鼠后小鼠体内的特异性抗体亚型IgG2a与IgG1的比值均小于1,说明重组蛋白NSP1在小鼠体内产生的特异性IgG更偏向于亚型IgG1,即重组蛋白NSP1在小鼠体内引起的免疫偏向于Th2型免疫(图8)。

2.6 中和抗体水平

病毒中和试验结果表明,重组蛋白NSP1在首次免疫后的第28天时就已经产生中和抗体,其抗体滴度为1:37,且这一中和抗体水平显著高于PBS对照组($P < 0.05$),疫苗组的中和抗体滴度为1:39,但重组蛋白NSP1组与疫苗组的中和抗体水平之间无显著差异($P > 0.05$)。第42天时重组蛋白NSP1的中和抗体滴度略有下降,为1:31(图9)。

3 讨论与结论

PRRSV感染引发的免疫抑制现象,涵盖了先天免疫反应的减弱以及获得性免疫反应的不

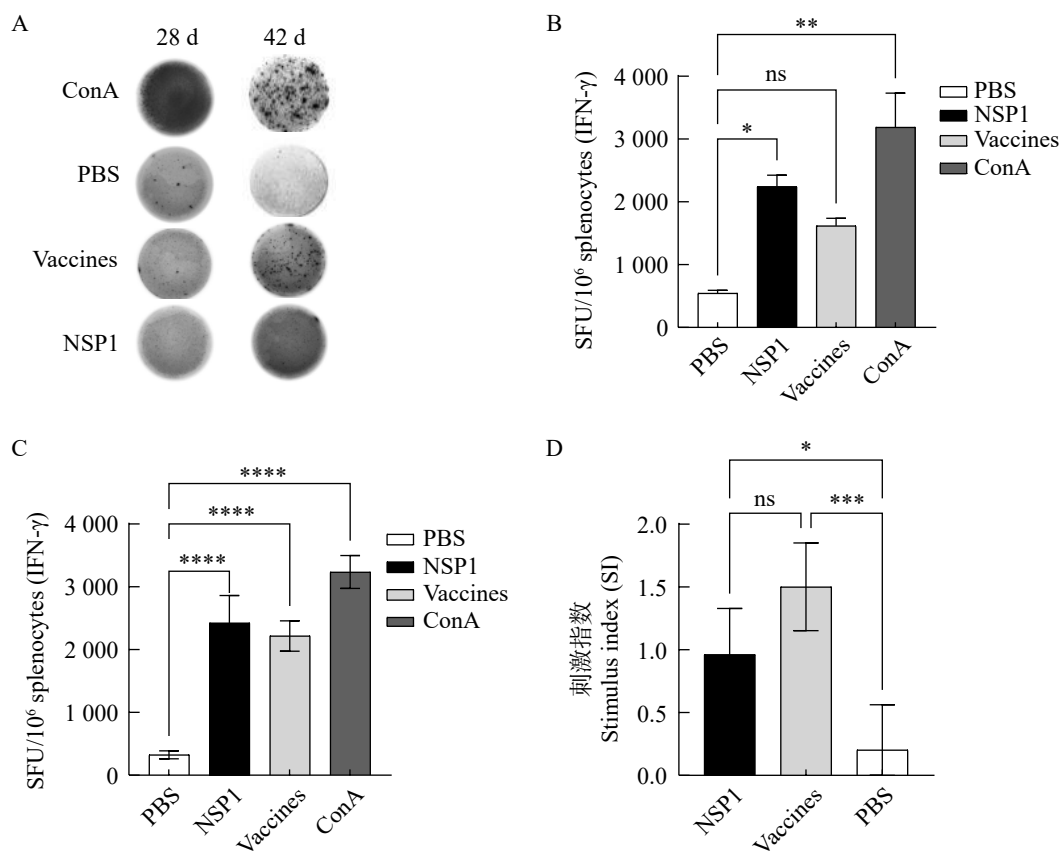


图6 淋巴细胞增殖活性与IFN- γ 的表达。A: Elispot结果斑点图; B: 28 d时IFN- γ 的表达; C: 42 d时IFN- γ 的表达; D: 28 d时淋巴细胞增殖活性。

Figure 6 Lymphocyte proliferation activity and IFN- γ expression. A: Elispot result spot map; B: Expression of IFN- γ at day 28; C: The expression of IFN- γ at day 42; D: Lymphocyte proliferation activity at day 28. ns: $P > 0.05$; *: $P < 0.05$; **: $P < 0.01$; ***: $P < 0.001$; ****: $P < 0.0001$.

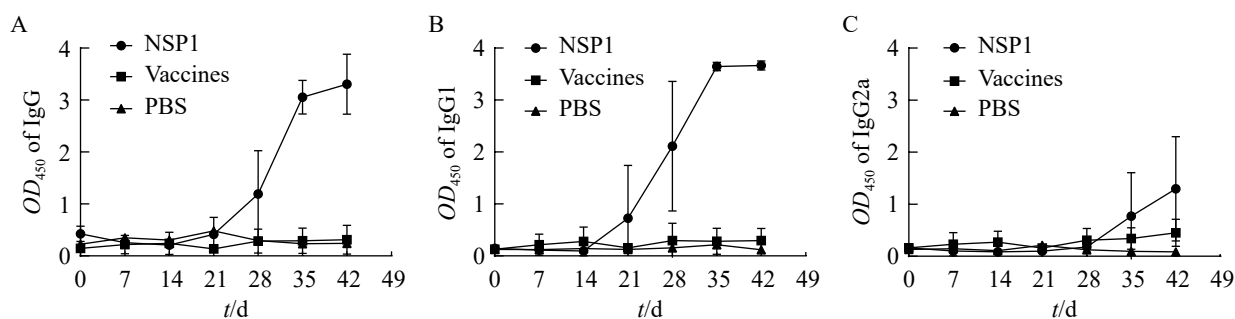


图7 重组蛋白NSP1在小鼠体内的特异性抗体水平。A: 特异性抗体IgG水平; B: 特异性抗体IgG1水平; C: 特异性抗体IgG2a水平。

Figure 7 Specific antibody levels of recombinant protein NSP1 in mice. A: Specific antibody IgG level; B: Specific antibody IgG1 level; C: Specific antibody IgG2a level.

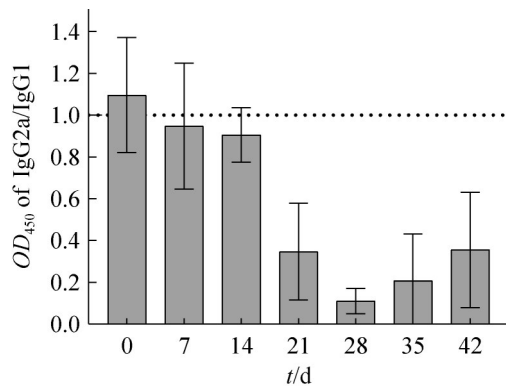


图8 特异性抗体亚型IgG2a与IgG1的比值

Figure 8 Ratio of specific antibody subtype IgG2a to IgG1.

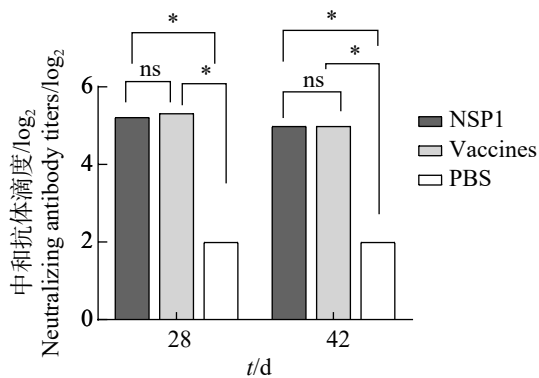


图9 重组蛋白NSP1免疫小鼠后的中和抗体水平

Figure 9 Neutralizing antibody levels in mice immunized with recombinant protein NSP1. ns: $P > 0.05$; *: $P < 0.05$.

良诱导，特别是中和抗体的产生延迟^[14-15]。以往的研究多聚焦于 PRRSV 结构蛋白(例如 N 或 GP5)的免疫反应，但这些蛋白的高度变异性阻碍了我们找到针对该病原体的有效策略。因此，开发新型疫苗对于控制 PRRS 疫情显得尤为关键^[16-17]。PRRSV 的 NSPs 被认为在病毒复制、转录以及宿主先天免疫反应的调节和逃避中扮演了重要角色。在这些 NSPs 中，NSP1 是动脉病毒感染过程中首个合成的病毒蛋白，它在病毒基因组复制中发挥作用，并被认为是迄今为止调节宿主细胞免疫反应最为有效的蛋白^[18]。

目前，国内尚无关于 PRRSV NADC30 毒株非结构蛋白 NSP1 作为亚单位疫苗抗原的研究报道。本研究首先对 PRRSV NADC30 毒株的 NSP1 蛋白进行了二级和三级结构的预测，随后将 NSP1 基因与大肠杆菌 pET-28a 载体连接并进行原核表达，最后对重组蛋白 NSP1 在小鼠体内的免疫效果进行了初步评估。

经过重组蛋白 NSP1 免疫处理后，小鼠体内能够产生 Th1 型细胞免疫和 Th2 型体液免疫反应。其中，IFN- γ 和 TNF- α 是 Th1 型细胞因子的主要代表，而 IL-4 与 IL-10 则是 Th2 型细胞因子的典型成员。IL-6 作为 B 细胞的刺激因子，能够诱导抗体参与免疫调节^[19-20]。本研究结果表明，重组蛋白 NSP1 在免疫小鼠第 28 天与第 42 天均可以显著地提高小鼠脾脏淋巴细胞中 IL-6 与 TNF- α mRNA 水平的表达，但对 IL-4 与 IL-10 的表达水平未产生明显影响。同时，Elispot 结果表明重组蛋白 NSP1 免疫后刺激小鼠脾脏淋巴细胞分泌的 IFN- γ 显著高于 PBS 对照组，表明重组蛋白 NSP1 免疫后可以促进机体产生细胞免疫应答。

最新研究揭示，NSP1 的 2 个亚基(NSP1 α 和 NSP1 β)均具备抑制 I 型干扰素产生的能力^[2,9,18]，特别是 NSP1 β ，它作为毒力因子，能够抑制宿主干扰素反应的多个环节^[21]。然而，一些研究者提出，动脉病毒 NSP1 的亚基在细胞核内的作用可能是多变的，其生物学功能与细胞内的分布紧密相关^[9]。本研究的结果表明，完整表达 NSP1 蛋白能够诱导 IFN- γ 和 TNF- α 的表达，从而促进机体的细胞免疫应答。这一现象可能与 2 个亚基之间的相互作用有关，其具体的作用机制尚需进一步探究。同时，尽管有研究指出 NSP1 α 和 NSP1 β 均参与了 TNF- α 启动子的抑制^[22]，但关于 PRRSV 诱导 TNF- α 表达的机制仍存在争议。Han 等^[18]研究显示，TNF- α 的表达具有毒株依赖性，与 PRRSV 的经典毒株相比，HP-PRRSV 导致的 TNF- α 表达水平较低。因此，本研究中观察到的 TNF- α 上调可能与 PRRSV NADC30 毒株的基因序列或其致病性有

关。综上所述,本研究结果证实了 NSP1 的重组表达能够激发小鼠的免疫反应,为 NSP1 作为保护性抗原的进一步研究提供了有力支持。

对于由多个亚基组成的蛋白质,亚基之间的相互作用和组装方式对蛋白质的功能至关重要。亚基结合位点发生改变或亚基之间的相互作用被破坏,可能会导致蛋白质的四级结构解体或改变,从而影响其功能。通过对 NSP1 蛋白及其亚基分别进行三级结构建模,并对 2 个亚基进行分子对接模拟,发现 NSP1 免疫功能发生改变可能与 2 个亚基之间的结合方式发生改变有关。然而,对蛋白三级结构进行预测只能作为一种猜测与预想,我们目前的研究只能确定 NSP1 蛋白的免疫效果,但其亚基在机体内具体发生了哪些作用或改变仍需进行深入研究。

Johnson 等^[12]研究表明,NSP1 可以在猪体内引起高且持续的抗体反应。为了进一步确定重组蛋白 NSP1 是否能够在小鼠体内产生体液免疫,本研究检测了免疫后小鼠血清中的抗体水平。结果表明重组蛋白 NSP1 在首次免疫后第 21 天时,血清中特异性抗体水平开始上升,并且到 42 天一直呈上升趋势。Th1 型细胞和 Th2 型细胞可分别促进 IgG2a 和 IgG1 的产生。对特异性抗体亚型进一步分析发现,小鼠血清中 IgG1 抗体水平显著升高,且 IgG2a/IgG1 的比值在免疫后一直小于 1,即免疫后可以引起小鼠产生强烈的 Th2 型体液免疫,进一步证明重组蛋白 NSP1 可以诱导机体产生体液免疫应答。

本研究的病毒中和试验结果表明,经过重组蛋白 NSP1 免疫后,小鼠体内能够产生中和抗体。在 28 天时中和抗体的效价达到 1:37,而到了 42 天效价为 1:31,这 2 个数值均显著高于 PBS 对照组,并且与商品化疫苗组之间无显著性差异。这说明重组蛋白 NSP1 免疫能够诱导小鼠产生高水平的特异性抗体和中和抗体,显示出良好的免疫原性。因此,非结构蛋白 NSP1 可被视为 PRRSV 亚单位疫苗的潜在候选抗原。

综合以上研究结果,本研究对 PRRSV NADC30

毒株的 NSP1 蛋白进行了结构预测,并通过原核表达系统成功表达了重组蛋白 NSP1。免疫小鼠后,发现重组蛋白 NSP1 能够激发机体产生细胞免疫和体液免疫反应,导致小鼠体内产生较高水平的特异性抗体和中和抗体。因此,重组蛋白 NSP1 被认为是制备亚单位疫苗的理想候选抗原,为 PRRSV 新型疫苗的研发提供了新的数据支持。

作者贡献声明

王文星:实验操作,数据收集和处理,论文撰写和修改;李红欢:实验技术指导,协助实验操作与论文修改;顾晓晓:协助实验操作;刘紫威:协助实验操作;吴澳迪:生物学分析;徐明国:生物学分析;马忠臣:论文写作指导与修改;陈创夫:实验设计。

作者利益冲突公开声明

作者声明不存在任何可能会影响本文所报告工作的已知经济利益或个人关系。

参考文献

- [1] 刘爱军,黄晓兵,章杭建,周彩琴,安慧婷,张传亮.猪繁殖与呼吸综合征病毒天然免疫逃逸机制研究进展[J].中国兽医学报,2024,44(8):1831-1840.
LIU AJ, HUANG XB, ZHANG HJ, ZHOU CQ, AN HT, ZHANG CL. Progress in evasion mechanisms of innate immunity by porcine reproductive and respiratory syndrome virus[J]. Chinese Journal of Veterinary Science, 2024, 44(8): 1831-1840 (in Chinese).
- [2] ZHANG H, SHA HY, QIN LM, WANG NN, KONG WL, HUANG LZ, ZHAO MM. Research progress in porcine reproductive and respiratory syndrome virus-host protein interactions[J]. Animals, 2022, 12(11): 1381.
- [3] FANG Y, SNIJDER EJ. The PRRSV replicase: exploring the multifunctionality of an intriguing set of nonstructural proteins[J]. Virus Research, 2010, 154(1/2): 61-76.
- [4] CHEN XX, QIAO SL, LI R, WANG J, LI XW, ZHANG GP. Evasion strategies of porcine reproductive and respiratory syndrome virus[J]. Frontiers in Microbiology, 2023, 14: 1140449.
- [5] KROESE MV, ZEVENHOVEN-DOBBE JC, BOS-DE RUIJTER JNA, PEETERS BPH, MEULENBERG JJM, CORNELISSEN LAHM, SNIJDER EJ. The nsp1alpha and nsp1 papain-like autoproteases are essential for porcine reproductive and respiratory syndrome virus RNA synthesis[J]. The Journal of General Virology, 2008, 89(Pt 2): 494-499.

- [6] 韩广伟. 两种弱毒疫苗对新发PRRSV-2的效力评价与PRRSV-2 NSP1 β 突变疫苗株、阻断单抗研制[D]. 杭州: 浙江大学博士学位论文, 2020.
HAN GW. Efficacy evaluation of two attenuated vaccines against newly emerging PRRSV-2 and development of mutant PRRSV-2 NSP1 β vaccine strain and blocking monoclonal antibody[D]. Hangzhou: Doctoral Dissertation of Zhejiang University, 2020 (in Chinese).
- [7] SUN YN, XUE F, GUO Y, MA M, HAO N, ZHANG XC, LOU ZY, LI XM, RAO ZH. Crystal structure of porcine reproductive and respiratory syndrome virus leader protease Nsp1 α [J]. *Journal of Virology*, 2009, 83(21): 10931-10940.
- [8] 宋艳华. 猪繁殖与呼吸综合征病毒NSP1非结构蛋白B细胞表位和ORF3-7结构蛋白T细胞表位的解析[D]. 南京: 南京农业大学博士学位论文, 2012.
SONG YH. Analysis of B cell epitope of NSP1 nonstructural protein and T cell epitope of ORF3-7 structural protein of porcine reproductive and respiratory syndrome virus[D]. Nanjing: Doctoral Dissertation of Nanjing Agricultural University, 2012 (in Chinese)
- [9] HAN MY, KIM CY, ROWLAND RRR, FANG Y, KIM D, YOO D. Biogenesis of non-structural protein 1 (nsp1) and nsp1-mediated type I interferon modulation in arteriviruses[J]. *Virology*, 2014, 458: 136-150.
- [10] CONTRERAS-LUNA MJ, FRAGOSO-GONZALEZ G, SEGURA-VELÁZQUEZ RA, CERVANTES-TORRES JB, ALONSO-MORALES R, RAMÍREZ-MARTÍNEZ LA, AYÓN-NÚÑEZ DA, BOBES RJ, SÁNCHEZ-BETANCOURT JI. Immunogenic and antigenic analysis of recombinant NSP1 and NSP11 of PRRS virus[J]. *Veterinary Medicine and Science*, 2022, 8(2): 610-618.
- [11] RASCÓN-CASTELO E, BURGARA-ESTRELLA A, MATEU E, HERNÁNDEZ J. Immunological features of the non-structural proteins of porcine reproductive and respiratory syndrome virus[J]. *Viruses*, 2015, 7(3): 873-886.
- [12] JOHNSON CR, YU WQ, MURTAUGH MP. Cross-reactive antibody responses to nsp1 and nsp2 of porcine reproductive and respiratory syndrome virus[J]. *The Journal of General Virology*, 2007, 88(Pt 4): 1184-1195.
- [13] NAN YC, WU CY, GU GQ, SUN WY, ZHANG YJ, ZHOU EM. Improved vaccine against PRRSV: current progress and future perspective[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2017, 8: 1635.
- [14] ROBINSON SR, LI J, NELSON EA, MURTAUGH MP. Broadly neutralizing antibodies against the rapidly evolving porcine reproductive and respiratory syndrome virus[J]. *Virus Research*, 2015, 203: 56-65.
- [15] LUNNEY JK, FANG Y, LADINIG A, CHEN NH, LI YH, ROWLAND B, RENUKARADHYA GJ. Porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV): pathogenesis and interaction with the immune system[J]. *Annual Review of Animal Biosciences*, 2016, 4: 129-154.
- [16] CHAND RJ, TRIBLE BR, ROWLAND RR. Pathogenesis of porcine reproductive and respiratory syndrome virus[J]. *Current Opinion in Virology*, 2012, 2(3): 256-263.
- [17] RENUKARADHYA GJ, MENG XJ, CALVERT JG, ROOF M, LAGER KM. Inactivated and subunit vaccines against porcine reproductive and respiratory syndrome: current status and future direction[J]. *Vaccine*, 2015, 33(27): 3065-3072.
- [18] HAN MY, YOO D. Modulation of innate immune signaling by nonstructural protein 1 (nsp1) in the family Arteriviridae[J]. *Virus Research*, 2014, 194: 100-109.
- [19] CHEN Y, SONG TY, XIAO YL, WAN XP, YANG LY, LI JH, ZENG GZ, FANG PF, WANG ZZ, GAO R. Enhancement of immune response of piglets to PCV-2 vaccine by porcine IL-2 and fusion IL-4/6 gene entrapped in chitosan nanoparticles[J]. *Research in Veterinary Science*, 2018, 117: 224-232.
- [20] KISHIMOTO T. Interleukin-6: discovery of a pleiotropic cytokine[J]. *Arthritis Research & Therapy*, 2006, 8(Suppl 2): S2.
- [21] HAN MY, KE HZ, ZHANG QZ, YOO D. Nuclear imprisonment of host cellular mRNA by nsp1 β protein of porcine reproductive and respiratory syndrome virus[J]. *Virology*, 2017, 505: 42-55.
- [22] SUBRAMANIAM S, KWON B, BEURA LK, KUSZYNSKI CA, PATTHAIK AK, OSORIO FA. Porcine reproductive and respiratory syndrome virus non-structural protein 1 suppresses tumor necrosis factor- α promoter activation by inhibiting NF- κ B and Sp1[J]. *Virology*, 2010, 406(2): 270-279.