

鹅坦布苏病毒非结构蛋白 NS1 的原核表达及纯化

赵冬敏, 黄欣梅, 刘宇卓, 张敬峰, 韩凯凯, 谢星星, 周晓波, 李 银

(江苏省农业科学院 兽医研究所, 农业部兽用生物制品工程技术重点实验室, 国家兽用生物制品工程技术研究中心, 江苏 南京 210014)

摘要: 根据鹅坦布苏病毒 JS804 株非结构蛋白 *NS1* 基因序列, 设计 1 对特异性引物, 利用 PCR 方法扩增得到完整的 *NS1* 基因, 并将其克隆至原核表达载体 pET28a 和 pET32a 上, 构建出重组表达质粒 pET28a-*NS1* 和 pET32a-*NS1*, 转化至 BL21(DE3) 中, 经 IPTG 诱导得到 *NS1* 融合蛋白(His-*NS1*), 其分子质量约分别为 44、58 kDa, 均在诱导后 6 h 达到表达量高峰。分析显示, 2 种融合蛋白均以包涵体形式存在, 包涵体经过变性和复性后均可获得单一、高表达量的目的蛋白, 为进一步开展关于鹅坦布苏病毒 *NS1* 蛋白的研究奠定了基础。

关键词: 鹅坦布苏病毒; *NS1* 蛋白; 原核表达

中图分类号: Q78 文献标识码: A 文章编号: 1000-7091(2012)06-0011-04

Prokaryotic Expression and Purification of Nonstructural Protein NS1 of Goose Tembusu Virus

ZHAO Dong-min, HUANG Xin-mei, LIU Yu-zhuo, ZHANG Jing-feng,

HAN Kai-kai, XIE Xing-xing, ZHOU Xiao-bo, LI Yin

(Institute of Veterinary Science, Jiangsu Academy of Agricultural Science, Key Laboratory of Veterinary Biologicals Engineering and Technology, Ministry of Agriculture, National Center for Engineering Research of Veterinary Bio-products, Nanjing 210014, China)

Abstract: The goose tembusu virus JS804 strain non-structural protein *NS1* gene was amplified by PCR with the specific primers designed on the basis of *NS1* gene and then was inserted into the prokaryotic vector pET28a and pET32a for the construction of recombinant expression plasmid pET28a-*NS1* and pET32a-*NS1*. Then pET28a-*NS1* and pET32a-*NS1* were transformed respectively into *Escherichia coli* BL21(DE3). The recombinant protein *NS1*s (His-*NS1*) were obtained with the induction of IPTG and the molecular weight of the fusion protein was 44 kDa and 58 kDa respectively. After 6 h induction by IPTG, the yield of fusion proteins reached peaks. The analysis showed that two fusion proteins were expressed in *Escherichia coli* into inclusion bodies. The fusion protein was purified to pure and high-level proteins by extracting the inclusion bodies with urea. The results laid the foundation for the further studies on the *NS1* protein of goose tembusu virus.

Key words: Goose tembusu virus; *NS1* protein; Prokaryotic expression

2010 年 4-11 月, 江苏等地鸭、鹅发生了一种以产蛋率、采食量显著下降, 出现脑炎样神经症状为特征的传染病, 感染鸭、鹅群主要表现为采食量和产蛋急速下降, 依发病日龄不同, 死亡率为 5%~28%。病理剖检的特征性变化主要见于卵巢, 表现为卵泡出血、变性和破裂, 通过病原分离和系统的实验室诊断, 确定病原为鸭、鹅坦布苏病毒。该病是

2010 年以来危害养鸭、鹅业最严重的疾病之一^[1-5]。

鹅坦布苏病毒是不分节段的单股正链 RNA 病毒, 属于黄病毒科(Flaviviridae), 黄病毒属。其基因组大约 11 kb, 编码 3 个结构蛋白: 核衣壳蛋白(C)、外膜蛋白(PrM and M) 和囊膜蛋白(E) 及 7 个非结构蛋白(NS1、NS2A、NS2B、NS3、NS4A、NS4B 和

收稿日期: 2012-08-10

基金项目: 江苏省自然科学基金项目(BK2012376); 国家自然科学基金项目(31172345); 江苏省农业科技自主创新资金项目(cx(11)4039)

作者简介: 赵冬敏(1982-), 女, 山东兖州人, 助理研究员, 博士, 主要从事家禽重大疫病流行病学和致病分子机制的研究。

通讯作者: 李 银(1966-), 男, 内蒙古赤峰人, 研究员, 博士, 主要从事家禽疫病流行病学和防治研究。

NS5)^[6]。NS1 蛋白属于非结构蛋白,已有研究显示,NS1 蛋白具有如下生物学功能和特性:参与病毒 RNA 复制和病毒的增殖过程^[7-10];能在感染细胞表面表达并分泌到胞外^[11-12];含有 T 细胞表位和 B 细胞表位,参与病毒感染后的免疫应答,作为病毒的主要抗原成分之一,在没有其他病毒蛋白的条件下诱导保护性免疫反应^[13-14]。由此可知,坦布苏病毒 NS1 蛋白在病毒感染过程中具有多种重要的生物学功能,对其的研究将拓展目前对于鹅坦布苏病毒的认识,了解坦布苏病毒非结构蛋白的功能,为进一步明确病毒的致病机理、防控疫病的流行提供理论基础。

本研究克隆并表达了鹅坦布苏病毒 JS804 株 NS1 片段,利用大肠杆菌表达系统获得了重组 NS1 蛋白的大量表达,为进一步研究其生物学特性、免疫功能 and 血清学检测奠定基础。

1 材料和方法

1.1 质粒、菌株

含有鹅坦布苏病毒 JS804 株全基因的质粒、pET28a 和 pET32a 原核表达载体,宿主菌 DH5 α 、BL21(DE3)均由农业部兽用生物制品工程技术重点实验室保存。

1.2 主要试剂

琼脂糖凝胶回收试剂盒、小量提取质粒试剂盒等购自 Axygen 公司;pMD18-T 载体、T4 DNA 连接酶、Ex Taq 酶、限制性内切酶、DNA Marker 等购自大连宝生物有限公司;其他试剂均为进口分装或国产分析纯。

1.3 NS1 基因的克隆

1.3.1 引物设计 根据 GenBank 中登录的鹅坦布苏病毒 JS804 株(登录号:JF895923) NS1 基因序列,设计 PCR 扩增引物,其中上游引物为 NS1F: 5'-GTAGAATTCGACACGGGGTCTCA-3',划线部分为引入的 EcoR I 酶切位点。下游引物为 NS1R: 5'-ACCGTCGACAGCCATGACCTTTGA-3',划线部分为引入的 Sal I 酶切位点。pET28a 和 pET32a 均采用上述引物扩增 NS1 基因。以上引物由南京金斯瑞生物有限公司合成,预期扩增片段大小为 1 056 bp。

1.3.2 NS1 基因的 PCR 扩增 以含有鹅坦布苏病毒 JS804 株全基因的质粒为模板进行 PCR 扩增。PCR 反应体系为 25 μ L,其中双蒸水 15.5 μ L,10 \times PCR Buffer 2.5 μ L,25 mmol/L MgCl₂ 1.5 μ L,dNTP (2.5 mmol/L) 2 μ L,上、下游引物(25 pmol/ μ L)各 1 μ L,模板 DNA 1.0 μ L,Ex Taq(5 U/ μ L) 0.5 μ L。PCR 反应程序:94 $^{\circ}$ C 预变性 5 min;94 $^{\circ}$ C 变性 30 s,

52 $^{\circ}$ C 退火 30 s,72 $^{\circ}$ C 延伸 1.5 min,30 个循环;然后 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min。循环反应结束后,将扩增产物进行 1.5% 琼脂糖凝胶电泳检测,并对 PCR 产物进行胶回收。纯化的 PCR 产物片段与 pMD18-T 克隆载体连接成重组质粒,转化 *E. coli* DH5 α 感受态细菌。经酶切鉴定后,挑选阳性克隆质粒送南京金斯瑞生物有限公司进行基因序列测定。测序结果在 NCBI 进行在线比对分析。

1.4 重组表达质粒的构建与鉴定

将 pMD18-T-NS1、pET28a、pET32a 质粒分别用 EcoR I 和 Sal I 双酶切。用 T4 DNA 连接酶将酶切后的 NS1 基因分别与 pET28a、pET32a 载体连接,转化 BL21(DE3) 感受态细胞,构建重组表达载体。经酶切鉴定后,挑选阳性克隆质粒送南京金斯瑞生物有限公司进行基因序列测定,并进行序列分析。

1.5 NS1 蛋白的诱导表达与 SDS-PAGE 分析

分别取含 pET28a-NS1 和 pET32a-NS1 重组质粒的阳性 BL21(DE3) 菌液,接种于 5 mL 含有氨苄青霉素(100 μ g/mL)的 LB 液体培养基中,37 $^{\circ}$ C 培养过夜。次日取 100 μ L 接种于 10 mL 含有氨苄青霉素(100 μ g/mL)的 LB 液体培养基中,37 $^{\circ}$ C 振荡培养至 OD₆₀₀ 值达 0.3~0.4,以终浓度 1 mmol/L IPTG 诱导表达,分别于诱导后 2、3、4、5、6 h 取 500 μ L 菌液,12 000 r/min 离心 5 min,弃上清,沉淀用生理盐水重悬后与 4 \times 蛋白电泳上样缓冲液混匀,沸水浴 5 min,以 pET28a 和 pET32a 空载体进行同样的操作作为对照,进行 SDS-PAGE 蛋白电泳观察结果。

1.6 重组 NS1 蛋白在菌体中的分布

取 5 mL 1 mmol/L IPTG 诱导 6 h 的菌液,12 000 r/min 离心 5 min,弃上清,沉淀用 3 mL 菌体裂解液重悬,超声波破碎 15 min,12 000 r/min 离心 5 min,分别取上清和沉淀与 4 \times 蛋白电泳上样缓冲液混匀,沸水浴 5 min,进行 SDS-PAGE 蛋白电泳观察结果,以确定表达蛋白存在的位置。

1.7 重组 NS1 蛋白包涵体的纯化

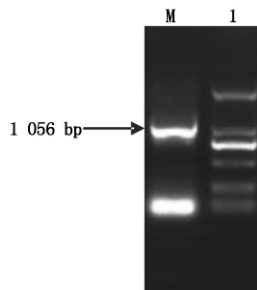
经 1 mmol/L IPTG 诱导 6 h 的菌液 200 mL,12 000 r/min 离心 5 min,弃上清,沉淀用 30 mL 菌体裂解液重悬,超声波破碎 30 min,至悬液形成均一透光的溶液,12 000 r/min 离心 5 min,收集沉淀。用包涵体洗涤液反复重悬洗涤沉淀 3 次,12 000 r/min 离心 5 min,弃上清。沉淀按质量与体积比为 1:2 加入包涵体裂解液(含 8 mol/L 尿素),冰上裂解 60 min,每隔 10 min 吹打一次。裂解完毕后,将裂解液 12 000 r/min 离心 5 min,取上清液装入透析袋中。分别在 6、4、2、0 mol/L 的尿素中进行透析,每个浓

度 12 h。终产物进行 SDS-PAGE 电泳检测。

2 结果与分析

2.1 鹅坦布苏病毒 NS1 基因的扩增

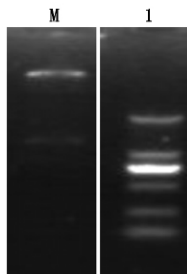
以含有鹅坦布苏病毒 JS804 株全基因的质粒为模板,用所设计的特异性引物扩增 NS1 基因全长,结果扩增的片段大小约为 1 kb,与预期大小相符(图 1)。



M. DL2000 分子量 Marker; 1. NS1 扩增片段。
M. DL2000 DNA Marker; 1. PCR products of NS1 gene.

图 1 鹅坦布苏病毒 NS1 基因 PCR 扩增结果

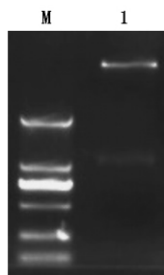
Fig. 1 PCR amplification of NS1 gene of goose tembusu virus



M. DL2000 分子量 Marker; 1. 重组质粒 pET28a-NS1
EcoRI 和 SalI 酶切鉴定。
M. DL2000 DNA Marker; 1. Product of recombinant plasmid
pET28a-NS1 digested with restriction enzymes EcoRI and SalI.

图 2 重组质粒 pET28a-NS1 的酶切鉴定

Fig. 2 Identification of recombinant plasmid
pET28a-NS1 by enzyme digestion



M. DL2000 分子量 Marker; 1. 重组质粒 pET32a-NS1
EcoRI 和 SalI 酶切鉴定。
M. DL2000 DNA Marker; 1. Product of recombinant plasmid
pET32a-NS1 digested with restriction enzymes EcoRI and SalI.

图 3 重组质粒 pET32a-NS1 的酶切鉴定

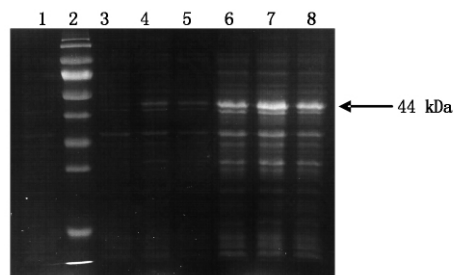
Fig. 3 Identification of recombinant plasmid
pET32a-NS1 by enzyme digestion

2.2 NS1 重组表达质粒的构建

提取重组质粒 pET28a-NS1 和 pET32a-NS1,经限制性内切酶 EcoRI 和 SalI 酶切后,经琼脂糖凝胶电泳检测,分别得到 2 个片段,大小与预期相符(图 2 3),测序结果表明,NS1 基因以正确方式分别插入 pET28a 和 pET32a 载体中且序列正确。

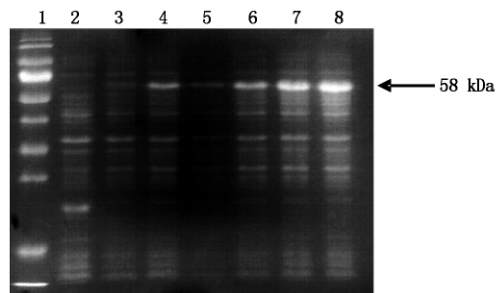
2.3 NS1 蛋白的诱导表达与 SDS-PAGE 分析

将鉴定为阳性的细菌进行 IPTG 诱导表达,经 SDS-PAGE 检测后发现,以 1 mmol/L IPTG 诱导时,pET28a-NS1 和 pET32a-NS1 均在诱导后 2 h 出现目的条带,大小约分别为 44 kDa 和 58 kDa 的融合蛋白,与预期蛋白的大小一致,两者均在诱导 6 h 时表达量最高(图 4 5)。



1. pET 28a 空载体; 2. 蛋白质分子量 Marker(由上到下分别为 170, 130, 100, 70, 55, 40, 35, 25, 15, 10 kDa);
3~8. 分别为诱导后 0, 2, 3, 4, 5, 6 h 表达的蛋白。
1. Control of vector pET28a; 2. Protein Marker; 3~8. Induced
pET28a-NS1 for 0, 2, 3, 4, 5, 6 h.

图 4 pET28a-NS1 重组蛋白的 SDS-PAGE 检测
Fig. 4 Analysis of pET28a-NS1 fusion protein by SDS-PAGE



1. 蛋白质分子量 Marker(由上到下分别为 170, 130, 100, 70, 55, 40, 35, 25, 15, 10 kDa); 2. pET 32a 空载体; 3~8. 分别为诱导后 0, 2, 3, 4, 5, 6 h 表达的蛋白。
1. Protein Marker; 2. Control of vector pET32a; 3~8. Induced
pET32a-NS1 for 0, 2, 3, 4, 5, 6 h.

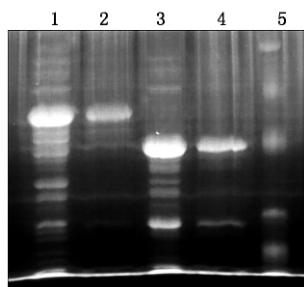
图 5 pET32a-NS1 重组蛋白的 SDS-PAGE 检测
Fig. 5 Analysis of pET32a-NS1 fusion protein by SDS-PAGE

2.4 重组 NS1 蛋白在菌体中的分布

将诱导表达 6 h 的细菌进行超声波裂解,经 SDS-PAGE 电泳分析,结果发现 pET28a-NS1 和 pET32a-NS1 融合蛋白均以包涵体形式存在。

2.5 重组 NS1 蛋白包涵体的纯化

收集诱导表达后菌体的包涵体,经洗涤纯化、复性后,经 SDS-PAGE 电泳检测发现,获得了较纯的目的蛋白(图 6)。



1. pET32a-NS1 菌体纯化前的蛋白谱; 2. pET32a-NS1 经包涵体纯化后的融合蛋白; 3. pET28a-NS1 菌体纯化前的蛋白谱; 4. pET28a-NS1 经包涵体纯化后的融合蛋白; 5. 蛋白质分子量 Marker(由上到下分别为 120 85 50 35 25 20 kDa)。
1. Induced pET32a-NS1 before purification; 2. Purified fusion protein of pET32a-NS1; 3. Induced pET28a-NS1 before purification; 4. Purified fusion protein of pET28a-NS1; 5. Protein Marker.

图 6 纯化后重组 NS1 蛋白的 SDS-PAGE 检测

Fig. 6 Analysis of purified recombinant NS1 protein by SDS-PAGE

3 讨论

由鹅坦布苏病毒引起的疫病在我国属新发传染病,可引起蛋鸭、种鹅死亡和产蛋下降,几乎所有鸭、鹅场均遭受了巨大经济损失,虽然该病已在中国南方大部分地区广泛流行,但对病原的生物学特性、致病机理、流行规律尚未进行深入研究,这给本病的防控带来一定困难。

NS1 蛋白是坦布苏病毒的一种重要的非结构糖蛋白,较为保守,可能与病毒毒力有关,但确切功能尚未阐明。在病毒感染哺乳动物细胞时,NS1 蛋白主要有 3 种存在形式,与细胞内的细胞器相连或通过选择性运输途径分泌到细胞表面,或者以可溶性的糖基化方式释放到细胞上清中^[15]。研究发现,黄病毒属病毒分泌型 NS1 蛋白可随血液进行循环,针对 NS1 蛋白的这一特性,建立了多种针对 NS1 蛋白的 ELISA 检测方法,应用于坦布苏病毒感染的早期诊断、NS1 蛋白水平与病毒致病严重程度的关系,以及在多种黄病毒共流行地区不同病毒的鉴别诊断^[16]。目前普遍认为,NS1 可作为坦布苏病毒感染诊断中另一种潜在的诊断标志物。NS1 蛋白包含群特异性和型特异性决定簇,具有多种 T 和 B 细胞抗原表位,能够诱发细胞免疫和体液免疫应答,可作为病毒的主要抗原成分之一,在没有其他病毒蛋白的条件下诱导保护性免疫反应,因此,NS1 在坦布苏病毒疫苗的开发和研制中具有巨大的潜力和独特的吸引力。

本试验选用 pET-28a 和 pET-32a 原核表达载体均成功大量表达出鹅坦布苏病毒 NS1 蛋白。表达的目的蛋白虽以包涵体形式存在,但是通过简单的包涵体变性和复性等纯化步骤后均可获得高表达量、单一的目的蛋白,同时由于 2 个载体均携带有

His 标签,易于利用商品化镍柱对其进行纯化。本试验中选择的表达菌株为 BL21(DE3),这是一个广泛用于表达外源蛋白的宿主菌,尤其适合于融合表达系统。该细菌中缺少在细胞膜外的蛋白酶 *omp^T* 基因,还缺少多种蛋白酶,降低了重组产物表达后被细胞降解或剪切的概率。

综上所述,本研究实现了重组鹅坦布苏病毒 NS1 蛋白的高效表达,为今后制备鹅坦布苏病毒抗 NS1 蛋白型特异性单克隆抗体,建立鹅坦布苏病毒检测方法,研究 NS1 的生物学特性、免疫学特性和研制亚单位疫苗奠定基础。

参考文献:

- [1] 黄欣梅,李银,赵冬敏等.新型鹅黄病毒 JS804 毒株的分离与鉴定[J].江苏农业学报,2011,27(2):354-360.
- [2] 苏敬良.鸭的新型黄病毒 BYD 引起的产蛋下降综合征[J].兽医导刊,2011(4):27-29.
- [3] Cao Z, Zhang C, Liu Y, et al. Tembusu virus in ducks, China[J]. Emerg Infect Dis, 2011, 17(10): 1873-1875.
- [4] 张大丙.鸭出血性卵巢炎的研究进展[J].中国家禽,2011,33(14):37-38.
- [5] Yun T, Ye W, Ni Z, et al. Identification and molecular characterization of a novel flavivirus isolated from Pekin ducklings in China[J]. Vet Microbiol, 2012, 157(3/4): 311-319.
- [6] 姬希文,李雪松,李国新等.鸭坦布苏病毒 E 蛋白中和性单克隆抗体的制备[J].中国家禽,2012,34(4):25-32.
- [7] Muylaert I R, Galler R, Rice C M. Genetic analysis of the yellow fever virus NS1 protein: identification of a temperature-sensitive mutation which blocks RNA accumulation[J]. J Virol, 1997, 71(1): 291-298.
- [8] Lindenbach B D, Rice C M. Genetic interaction of flavivirus nonstructural proteins NS1 and NS4A as a determinant of replicase function[J]. J Virol, 1999, 73: 4611-4621.
- [9] Lindenbach B D, Rice C M. Trans-complementation of yellow fever virus NS1 reveals a role in early RNA replication[J]. J Virol, 1997, 71: 9608-9617.
- [10] Pacca C C, Severino A A, Mondini A, et al. RNA interference inhibits yellow fever virus replication in vitro and vivo[J]. Virus genes, 2009, 38(2): 224-231.
- [11] Alcon-LePoder S, Sivard P, Drouet M T, et al. Secretion of flaviviral non-structural protein NS1: from diagnosis to pathogenesis[J]. Novartis Found Symp, 2006, 277: 233-247.
- [12] Avirutnan P, Punyadee N, Noisakran S, et al. Vascular leakage in severe dengue virus infections: a potential role for the nonstructural viral protein NS1 and complement[J]. J Infect Dis, 2006, 193(8): 1078-1088.
- [13] Schlesinger J J. Flavivirus nonstructural protein NS1: complementary surprises[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2006, 103(50): 18879-18880.
- [14] Tafuku S, Miyata T, Tadano M, et al. Japanese encephalitis virus structural and nonstructural proteins expressed in *Escherichia coli* induce protective immunity in mice[J]. Microbes Infect, 2012, 14(2): 169-176.
- [15] Mackenzie J M, Jones M K, Young P R. Immunolocalization of the dengue virus nonstructural glycoprotein NS1 suggests a role in viral RNA replication[J]. Virology, 1996, 220: 232-240.
- [16] Konishi E, Kitai Y. Detection by ELISA of antibodies to Japanese encephalitis virus nonstructural 1 protein induced in subclinically infected humans[J]. Vaccine, 2009, 27(50): 7053-7058.