

猪日本乙型脑炎病毒 NS1 基因的表达和抗体制备

沈红霞, 韩秀杰, 赵凡凡, 张保新, 余风艳, 王晓杜

(浙江农林大学 林业与生物技术学院, 浙江 临安 311300)

摘要: 猪 *Sus scrofa domestica* 日本乙型脑炎病毒 (Japanese encephalitis virus, JEV) 是引起母猪繁殖机能障碍的重要病原之一, 其 NS1 蛋白参与病毒复制和组装、调节宿主免疫反应功能。提取猪日本乙型脑炎上海分离株的基因组 RNA, 反转录合成 cDNA, 扩增该病毒的 NS1 基因片段, 亚克隆到原核表达载体 pET-28(a) 上, 构建重组原核表达质粒 pET-28(a)-JEV-NS1, 转化大肠埃希菌 *Escherichia coli* BL21(DE3) 菌株, IPTG 诱导表达重组 JEV-NS1 蛋白, 获得分子量大小为 46 kDa 的重组蛋白。为了提高表达量, JEV-NS1 基因的 958~1 245 bp 被截短。聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE) 分析表明: JEV-NS1 表达量明显提高, 纯化后含量达到总蛋白的 85% 以上。纯化后的蛋白免疫 ICR 小鼠 *Mus musculus*, 制备了小鼠抗 JEV-NS1 多克隆抗体, western-blotting 验证了 JEV-NS1 的抗原性和抗体的特异性。图 6 参 13

关键词: 动物学; 日本乙型脑炎病毒; NS1; 原核表达; 纯化; 抗体

中图分类号: S852.65

文献标志码: A

文章编号: 2095-0756(2013)03-0396-05

Expression and antibody preparation of nonstructural protein 1 for Japanese encephalitis virus from pigs

SHEN Hongxia, HAN Xiujie, ZHAO Fanfan, ZHANG Baoxin, YU Fengyan, WANG Xiaodu

(School of Forestry and Biotechnology, Zhejiang A & F University, Lin'an 311300, Zhejiang, China)

Abstract: Japanese encephalitis virus (JEV) in breeding pigs, has caused reproductive disorders, such as orchitis, stillbirths, and mummified fetuses, and has produced encephalitis in piglets. The NS1 (nonstructural protein 1) gene is associated with viral RNA packaging and replication and with viral anti-host immunity. NS1 protein were expressed by prokaryotic expression system and polyclonal antibodies of NS1 were prepared. In this study, the cDNA of JEV was synthesized from a viral genome by reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR). The NS1 gene was cloned from cDNA by PCR and subcloned into pET-28(a) plasmid. The recombinant plasmid pET-28(a)-JEV-NS1 was then transformed into *Escherichia coli* BL21(DE3). Next, the recombinant JEV-NS1 protein (whose molecular weight is 46 kDa) was expressed by isopropyl-beta-D-thiogalactopyranoside (IPTG) induction. To improve the expression level of the recombinant JEV-NS1 protein, the 958–1 245 bp of the JEV-NS1 gene was truncated, and sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) was used for the analysis. Also, the protein was immunized into an Institute of Cancer Research (ICR) mouse; then the mouse anti-JEV-NS1 antiserum was prepared; the antiserum specificity were detected with western-blotting. Results showed that the truncated JEV-NS1 expression was greatly increased and the SDS-PAGE analysis confirmed this. In addition, purification production of the recombinant protein was 85% of the total protein content. The antiserum of NS1 can specifically recognized the production of JEV infected cells. This study will assist in JEV-NS1 functional research and exploration of JEV pathogenic mechanism. [Ch, 6 fig. 13 ref.]

收稿日期: 2012-05-04; 修回日期: 2012-06-14

基金项目: 浙江省自然科学基金资助项目 (Y3110124); 浙江农林大学人才启动基金资助项目 (2010FR080)

作者简介: 沈红霞, 从事动物病毒分子生物学研究。E-mail: 15868179023@163.com。通信作者: 王晓杜, 讲师, 博士, 从事动物病毒分子生物学研究。E-mail: xiaoduwang@163.com

Key words: zoology; Japanese encephalitis virus; nonstructural protein 1; prokaryotic expression; purification; antibody

乙型脑炎病毒(Japanese encephalitis virus, JEV), 又称日本脑炎病毒, 可引起以中枢神经系统损害为主的虫媒性人畜共患病, 即乙型脑炎或日本脑炎。中国乙脑发病人数占世界总发病数的 80%以上^[1]。JEV 可以感染蚊子 Culicidae 和猪 *Sus scrofa domesticus*, 作为 JEV 的寄存宿主, 猪感染乙脑病毒后表现为繁殖机能障碍, 母猪表现为产死胎、木乃伊胎等。该病不仅严重影响养猪业的健康发展, 也是兽医公共卫生重点关注的疾病之一。JEV 属黄病毒科 Flaviviridae 黄病毒属 *Flavivirus*, 其基因组为单股、正链 RNA 分子, 其长度约为 11 kb(10 976 bp), 从 5'端 96 位 ATG 起始, 至 3'端 10 393 位终止, 仅形成 1 个长约 10.3 kb 的开放读码框架 (ORF), 编码 1 个长为 3 432 个氨基酸残基的蛋白前体, 在宿主细胞内蛋白酶和病毒蛋白酶的切割下, 它产生 3 种结构蛋白(C 蛋白、PrM/M 和 E 蛋白)以及 7 种非结构蛋白(NS1, NS2a, NS2b, NS3, NS4a, NS4b 和 NS5)^[2-3]。该病毒经过几十年的进化, 现存 5 种基因型, 整个亚洲 JEV 的各种基因型都有流行^[4]。其中 JEV-NS1 基因全长约 1 245 bp, 预测分子量为 40 kDa 左右, 由于 N 端存在糖基化位点, 所以在病毒感染细胞中是分子量为 46 kDa 的糖蛋白^[5]。前体蛋白首先在 E-NS1 位点裂解后, NS1 转位到内质网膜上, 然后 NS1~NS2a 位点发生裂解, 产生成熟的 NS1^[6]。NS1 的主要功能是作为病毒 RNA 复制的共因子, 参与病毒 RNA 的合成。与此同时, 因它能分泌到胞外, 激发机体产生针对 NS1 的抗体, 而此抗体能抵抗病毒的感染^[7], 所以 NS1 也与 E 和 M 蛋白一样, 作为疫苗开发的对象得到广泛研究。本研究克隆猪日本乙型脑炎的 NS1 基因, 构建重组原核表达载体, 在大肠埃希菌 *Escherichia coli* 中大量表达, 并纯化该重组蛋白, 制备小鼠抗 JEV-NS1 的抗体, 验证抗体的特异性, 为探讨该蛋白的功能及病毒复制的相关研究打下基础。

1 材料与方法

1.1 材料

猪日本乙型脑炎病毒 SH-JEV01 毒株由中国农业科学院上海兽医研究所马志永研究员惠赠; BHK-21 细胞, 原核表达载体 pET-28(a)、大肠埃希菌感受态细胞 DH5 α 和 BL21(DE3)为浙江农林大学兽医微生物学实验室保存。ICR 小鼠 *Mus musculus* 购于浙江省医科院实验动物中心。

核酸标准(DNA marker DL2000), 限制性内切酶 *EcoR* I 和 *Sal* I, AMV 反转录试剂盒, *Taq* DNA 聚合酶等购自大连宝生物公司; T4 DNA ligase 购于 NEB 公司; IPTG 和弗氏完全佐剂和弗氏不完全佐剂购于 Sigma 公司; Trizol 购自 invitrogen 公司; DNA 胶回收试剂盒购于上海华舜生物公司; A 型小量 DNA 片段快速纯化回收试剂盒, 质粒 DNA 小量提取试剂盒购于 axgen 生物有限公司。其他试剂为国产分析纯。

1.2 方法

1.2.1 病毒基因组 RNA 的提取 将 JEV 病毒感染的 BHK-21 细胞样品重悬于 Trizol 试剂中, 室温 10 min 后, 加入 1/3 体积氯仿, 反复混匀后室温 5 min。以 15 000 \cdot min⁻¹ 离心 15 min, 吸取上清液转移至另一离心管中, 加入等体积的异丙醇, 反复混匀后室温沉淀 5 min, 以 15 000 \cdot min⁻¹ 离心 15 min。去掉上清液后, 用 70%的乙醇洗涤沉淀 1 次, 室温干燥后, 溶于适量的 RNase free 水中, -20 $^{\circ}$ C 储存备用。

1.2.2 逆转录聚合酶链式反应(RT-PCR)扩增 JEV-NS1 基因 根据 AMV 反转录试剂盒说明书上的方法, 将上面提取的病毒基因组 RNA, 利用随机引物反转录合成 cDNA。以此 cDNA 为模板, *JEV-NS1* 引物上游 F: 5'gcggaattcatggacactggatgtg 3'; *JEV-NS1* 全长片段下游引物 R1: 5'gcggtcgacttaggcagcgactagc 3'(1~1 254 bp), *JEV-NS1* 突变体下游引物 R2: 5'gcggtcgacttacggaaggagcaactg 3'(1~957 bp), 在 PCR 管中加入如下 20 μ L 体系: RNase Free ddH₂O 14.3 μ L, 10 \times 缓冲液 2.0 μ L, dNTPs 1.6 μ L, 10 μ mol \cdot L⁻¹ 引物各 0.4 μ L, *Taq* 酶 0.3 μ L, cDNA 模板 1.0 μ L; 在 PCR 仪中以下面条件进行 PCR 扩增: 94 $^{\circ}$ C 预变性 5 min; 94 $^{\circ}$ C 变性 50 s, 58 $^{\circ}$ C 退火 50 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 2 min, 共 35 个循环; 循环结束后 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min, 最后 4 $^{\circ}$ C 保存。10.0 g \cdot L⁻¹ 琼脂糖凝胶电泳检测结果。

1.2.3 pET-28(a)-JEV-NS1 重组质粒构建 将上述胶回收的 *JEV-NS1* 的 PCR 产物和 pET-28(a)空质粒使用 *EcoR* I, *Sal* I 分别进行双酶切, 酶切回收后, 回收产物在 T4 连接酶作用下, 把 *JEV-NS1* 全长和突变

体亚克隆到 pET-28(a)载体上,转化大肠埃希菌 DH5 α ,挑取菌落经 PCR 和重组质粒双酶酶切鉴定为阳性者,送上海英骏生物公司测序鉴定。

1.2.4 重组蛋白 JEV-NS1 的诱导表达 上述阳性重组质粒 pET-28(a)-*JEV-NS1* 和 pET-28(a)-*JEV-NS1*-mutant 转化到大肠埃希菌 BL21(DE3)内,挑取克隆扩大培养,细菌生长到对数期时加入 1.0 mmol·L⁻¹ 的 IPTG 诱导,培养 3 h 后,取样并煮沸制备样品,SDS-PAGE 检测重组 JEV-NS1 和 JEV-NS1-mutant 蛋白表达情况。

1.2.5 重组蛋白 JEV-NS1 的纯化 将 1.2.4 鉴定好的表达 JEV-NS1 蛋白的阳性克隆扩大到 100.0 mL 进行培养,当细菌生长到对数期时,加入 1.0 mmol·L⁻¹ 的 IPTG,诱导表达 3 h 后,收集菌体,按照王晓杜等^[8]方法提取包涵体,溶解好的包涵体按照 his-band Ni+试剂盒说明书方法进行纯化,纯化后蛋白利用透析的方法进行复性,制备大量可溶性的重组 JEV-NS1 蛋白。聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)检测该蛋白包涵体提取和纯化效果。

1.2.6 多克隆抗体的制备 将纯化后的 JEV-NS1 蛋白与弗氏完全佐剂佐剂混合均匀(1:1),颈部皮下注射给 ICR 小鼠(50 μ g·只⁻¹),2 周后用弗氏不完全佐剂与蛋白混合后注射,以后隔 2 周注射 1 次,共免疫 4 次后采血,收集血清即为多克隆抗体。用酶联免疫吸附测定(ELISA)方法测定其效价。

1.2.7 抗体特异性检测 根据王晓杜^[9]的方法,分别以原核表达产物和病毒感染后 Vero 细胞的裂解产物作为上样样品,进行 SDS-PAGE,再以制备的小鼠抗 JEV-NS1 多克隆抗体作为一抗,western-blotting 显色,验证抗体的特异性。

2 结果与分析

2.1 *JEV-NS1* 基因 RT-PCR 结果

以 1.2.2 合成的 JEV cDNA 为模板,用带有 *EcoR* I 和 *Sal* I 酶切位点的引物,RT-PCR 扩增 *JEV-NS1* 的基因片段,所克隆的片段带有起始密码子 ATG 和终止密码子 TAA。PCR 产物经琼脂糖凝胶电泳检测,结果表明(图 1),本研究获得大小 1.3 kb 左右的片段,与预期大小基本一致。

2.2 重组质粒 pET-28(a)-*JEV-NS1* 的构建

用 *EcoR* I 和 *Sal* I 酶分别对 *JEV-NS1* 基因的 PCR 产物、pET-28(a)空载体进行双酶切,酶切产物经纯化试剂盒纯化回收后,*JEV-NS1* 基因的 PCR 产物、pET-28(a)空载体经 T4 连接酶连接,连接产物转化大肠埃希菌 DH5 α ,经菌落 PCR 鉴定为阳性的克隆,过夜培养后提取质粒,所获得的重组质粒再用 *EcoR* I 和 *Sal* I 进行双酶切鉴定,琼脂糖电泳,结果(图 2)为阳性的细菌克隆送上海桑尼生物公司测序。测序结果获得的序列,经美国国家生物技术信息中心(NCBI)上 Blast 比对,该片段与 NCBI 上公布的 *JEV-NS1* 基因序列同源性高达 99%(GenBank No: AF315119),说明本研究克隆到了 *JEV-NS1* 基因,并且该序列正确插入到 pET-28(a)空载体,重组表达载体 pET-28(a)-*JEV-NS1* 构建成功。

2.3 重组 JEV-NS1 蛋白的诱导表达

上述鉴定好的 pET-28(a)-*JEV-NS1* 重组表达质粒转化大肠埃希菌 BL21(DE3),挑取 2~3 个克隆过夜培养,重新转接培养至对数生长期后,1 mmol·L⁻¹ IPTG 诱导 3 h,在异丙基- β -D 硫代吡喃半乳糖苷(IPTG)诱导前和诱导后分别取样,加入 1 \times 十二烷基磺酸钠(SDS)上样缓冲液,煮沸裂解细菌,SDS-PAGE 电泳检测重组蛋白表达情况。结果表明:重组蛋白 JEV-NS1 在大肠埃希菌内大量表达(图 3),利用 DNASTAR 软件分析,预期分子量大小为(40+8) kDa,结果表明表达蛋白大小与预期一致(48 kDa 左右)。薄层扫描分析表明,表达的重组蛋白占总菌体蛋白的 20%以上。利用 his-band Ni+柱纯化,只能得到很少的蛋白,不能用于进行下一步实验。

2.4 *JEV-NS1*-mutant 重组蛋白的表达和纯化

根据网站预测(<http://nihserver.mbi.ucla.edu/RACC/>)发现 *JEV-NS1* 基因序列中大肠埃希菌稀有密码子有 20 个,特别是从 958 bp 开始有连续 3 个稀有密码子,这将限制该基因在大肠埃希菌中的表达,所以重新设计下游引物,按照 1.2.3 方法构建重组 pET-28(a)-*JEV-NS1*-mutant (958~1 245 bp 截短)质粒(图 4)。重组 pET-28(a)-*JEV-NS1*-mutant 质粒转化大肠埃希菌 BL21(DE3),经 IPTG 诱导,SDS-PAGE 检测表明(图 5),获得大小为 39 kDa 左右的重组蛋白(31 kDa+8 kDa),*JEV-NS1*-mutant 蛋白表达量明显上升,表达的重组蛋白占总菌体蛋白的 40%以上。经 his-band Ni+纯化,获得高纯度的重组 JEV-NS1-

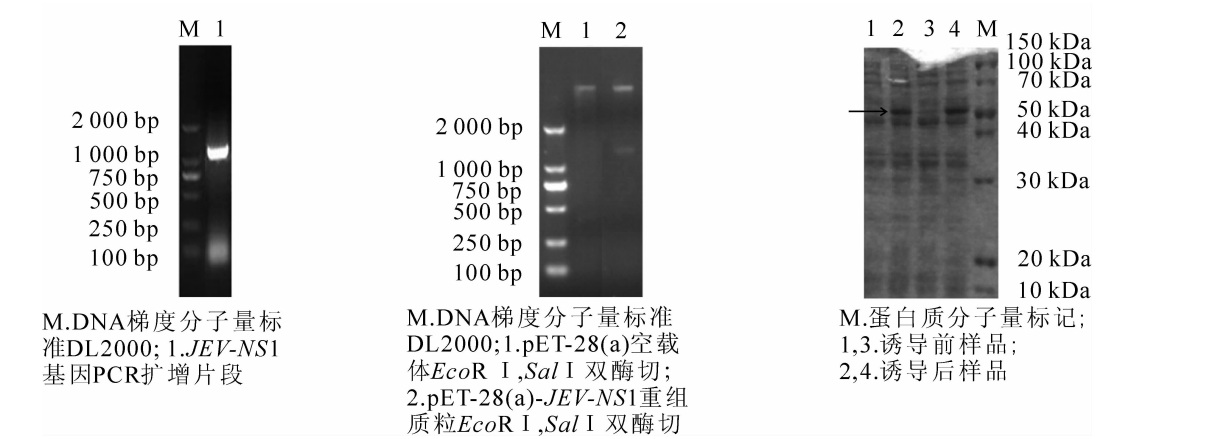


图 1 *JEV*-NS1 基因的 RT-PCR 扩增结果

Figure 1 Amplification of *JEV*-NS1 by RT-PCR

图 2 pET-28(a)-*JEV*-NS1 重组质粒的酶切鉴定

Figure 2 Digestion of recombinant plasmid pET-28(a)-*JEV*-NS1 by restrict enzyme

图 3 重组 *JEV*-NS1 蛋白的诱导表达

Figure 3 Expression of recombinant protein *JEV*-NS1 by IPTG induction

mutant 蛋白，占纯化后总蛋白的 85%以上。

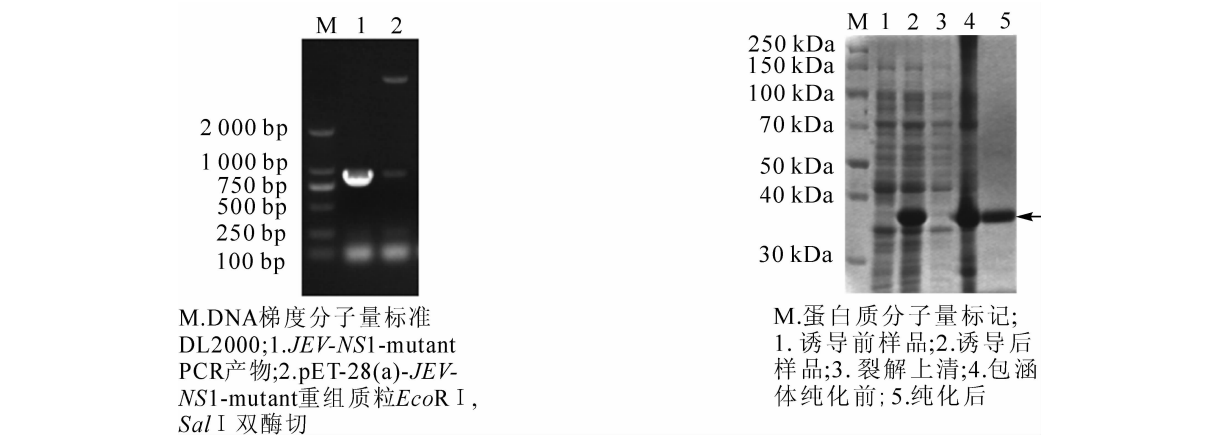


图 4 pET-28(a)-*JEV*-NS1-mutant 重组质粒的构建

Figure 4 Construction of recombinant plasmid pET-28(a)-*JEV*-NS1-mutant

图 5 重组 *JEV*-NS1-mutant 蛋白的诱导表达和纯化

Figure 5 Expression and purification of recombinant protein *JEV*-NS1-mutant by IPTG induction

2.5 JEV-NS1 免疫原性及抗体特异性鉴定

重组 JEV-NS1-mutant 蛋白免疫 ICR 小鼠，制备的小鼠抗 JEV-NS1 多克隆抗体，其 ELISA 效价为 2×10^5 。以原核表达产物(JEV-NS1，JEV-NS1-mutant)进行 SDS-PAGE，小鼠抗 JEV-NS1 作为一抗，western-blotting 检测抗体与抗原的反应性，结果表明：抗体能特异的识别 JEV-NS1 蛋白和 JEV-NS1-mutant 蛋白，证明该蛋白具有较好的免疫原性(图 6A)。病毒感染 vero 细胞 12，24，36，48 h 后，收取细胞样品，裂解后进行 SDS-PAGE，以本研究制备的小鼠抗 JEV-NS1 抗体作为一抗，western-blotting 检测抗体与病毒表达 JEV-NS1 蛋白的反应性，结果表明小鼠抗 JEV-NS1 抗体能特异识别病毒表达的 NS1 蛋白(图 6B)。

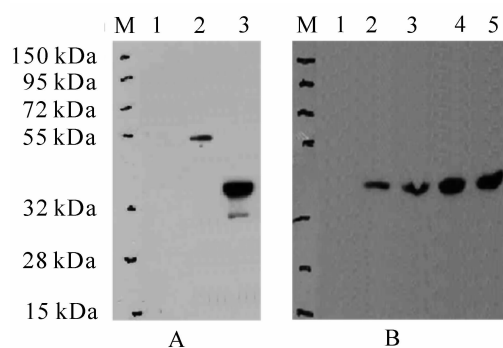
3 讨论

JEV 病毒的 NS1 蛋白在黄病毒科家族中具有较高的保守性，它能激发机体产生中和抗体，是 JEV 亚单位疫苗的候选者，其 DNA 疫苗具有较好的免疫保护能力^[10]。有较多的学者利用各种不同的表达系统表达该蛋白，一方面可以研究 NS1 在致病机制中的作用^[7]，另一方面可以建立检测 JEV 感染的方法^[11]。由于抗 NS1 抗体能通过 Fc 受体依赖的途径引发机体的保护性免疫^[12]，所以开发出针对 NS1 的许多单克隆抗体用于治疗 JEV 和黄病毒科病毒的感染^[13]。

本研究克隆了从猪群中分离的神经毒 JEV 病毒株的 NS1 基因, 该序列与美国国家生物技术信息中心上公布序列同源性 99% 以上, 在原核表达系统中大量表达重组蛋白 JEV-NS1, 表达量达到菌体总蛋白的 20% 以上, 表达量偏低。由于 JEV-NS1 基因的 958 bp 后有连续 3 个稀有密码子, 所以通过突变截短该基因, 使得重组蛋白表达量得到极大提高, 经纯化后达总蛋白的 85% 以上。利用高纯度的重组 JEV-NS1-mutant 蛋白免疫 IRC 小鼠, 制备了小鼠抗 JEV-NS1 抗体, 抗体效价水平较高, 特异性也较好, 为检测 JEV 试剂盒的建立提供工具, 也为研究其病毒诱导的细胞免疫中的作用和探讨其在病毒致病中的机理打下较好的基础。JEV 引起的母猪繁殖障碍给养猪业带来了重大危害, 该病在猪群中的发生具有重要的公共卫生学意义, 因此, 监测该病的流行情况, 控制它在猪群中的扩散, 研发抗病毒药物等措施都有利于该病的防控。

参考文献:

- [1] 陈焕春. 规模化养猪场疫病控制与净化[M]. 北京: 中国农业出版社, 2000: 187.
- [2] MASON P W, DALRYMPLE J M, GENTRY M K, *et al.* Molecular characterization of a neutralizing domain of the Japanese encephalitis virus structural glycoprotein [J]. *J Gen Virol*, 1989, **70**: 2037 – 2049.
- [3] YUN S I, LEE Y M. Japanese encephalitis virus: molecular biology and vaccine development [G] // KALITZKY M, BOROWSKI P. *Molecular Biology of the Flavivirus*. Norwich: Horizon Scientific Press, 2006: 225 – 271.
- [4] MOHAMMED M A, GALBRAITH S E, RADFORD A D, *et al.* Molecular phylogenetic and evolutionary analyses of Muar strain of Japanese encephalitis virus reveal it is the missing fifth genotype [J]. *Infect Genet Evol*, 2011, **11** (5): 855 – 862.
- [5] LINDENBACH B D, RICE C M. Molecular biology of flaviviruses [J]. *Adv Virus Res*, 2003, **59**: 23 – 61.
- [6] CHAMBERS T J, HAHN C S, GALLER R, *et al.* Flavivirus genome, organization, expression, and replication [J]. *Annu Rev Microbiol*, 1990, **44**: 649 – 688.
- [7] LIN Yiling, CHEN Likuang, LIAO C L, *et al.* DNA immunization with Japanese encephalitis virus nonstructural protein NS1 elicits protective immunity in mice [J]. *J Virol*, 1998, **72** (1): 191 – 200.
- [8] 王晓杜. 猪干扰素 α , β , γ 基因克隆原核表达及其单克隆抗体制备的研究[D]. 武汉: 华中农业大学, 2007. WANG Xiaodu. *The Study of Gene Clone And Expression of Porcine α , β , γ Interferon and its Preparation of Polyan-tibodies and monoantibodies Against Recombinant Protein*[D]. Wuhan: Huazhong Agricultural University, 2007.
- [9] 王晓杜. 猪流感病毒感染细胞内 p53 活性变化机制解析[D]. 北京: 中国农业科学院研究生院, 2010. WANG Xiaodu. *Analysis of Dynamics of p53 Activities in Swine Influenza virus Infected Cells* [D]. Beijing: Chinese Academy of Agriculture Sciences, 2010.
- [10] LI Yize, FLAMAND M, COUNOR D, *et al.* Expression and characterization of recombinant Japanese encephalitis virus NS1 protein in Drosophila S2 cell [J]. *BMC Proc*, 2008, **2** (supp 1): 36.
- [11] LI Yize, COUNOR D, LU Ping, *et al.* A specific and sensitive antigen capture assay for NS1 protein quantitation in Japanese encephalitis virus infection [J]. *J Virol Method*, 2012, **179** (1): 8 – 16.
- [12] CHUNG K M, THOMPSON B S, FREMONT D H, *et al.* Antibody recognition of cell surface-associated NS1 triggers Fc-gamma receptor-mediated phagocytosis and clearance of West Nile virus-infected cells [J]. *J Virol*, 2007, **81**: 9551 – 9555.
- [13] LEE T H, SONG B H, YUN S I, *et al.* A cross-protective mAb recognizes a novel epitope within the flavivirus NS1 protein [J]. *J Gen Virol*, 2012, **93**: 20 – 26.



A:小鼠抗JEV-NS1抗体与其原核表达产物的识别验证。M.蛋白质标记;1.诱导前样品;2. JEV-NS1诱导后样品;3.JEV-NS1-mutant诱导后样品。
B:小鼠抗JEV-NS1抗体与病毒表达产物识别验证。M.蛋白质标记;1.未感染细胞样品;2~5. JEV感染12, 24, 36, 48 h细胞样品。

图 6 JEV-NS1 抗原性和小鼠抗 JEV-NS1 抗体特异性验证

Figure 6 Immunogenicity of JEV-NS1 and the specificity of mouse anti-JEV-NS1 antibody