

H9N2 亚型禽流感病毒非结构蛋白(NS1)基因的克隆与表达

刘金华, 吴清民, 史为民, 郭玉璞

(中国农业大学农业部预防兽医学重点开放实验室, 北京, 100094)

Cloning and Expression of the Nonstructural Protein (NS1) of
the H9N2 Chicken Influenza Virus

LIU Jin-hua, WU Qing-min, SHI Wei-min, GUO Yu-pu

(College of Veterinary Medicine, China Agricultural University, Beijing 100094, China)

Abstract: The nonstructural protein (NS1) encoded by gene 8 of the Influenza virus is present in cells infected with Influenza virus. In this study, NS1 protein gene of the Chicken influenza virus A/chicken/Beijing/2/97 (H9N2) strain was amplified by PCR. The fragment contains *EcoR* I and *Xho* I restriction enzyme sites at the ends. The amplified product was cloned into the expression vector pET-30(c). Recombinant plasmid pET/NS1 was transformed into *E. coli* BL21(DE3) competent cells and induced with 0.4 mmol/L IPTG, the target protein was produced, the molecular weight of the expressed protein was 30 kDa as expected. Western-blot test indicated that the expressed protein can react with the NS1 monoclonal antibody of the influenza virus. This study laid an important foundation for H9N2 subtype avian influenza surveillance in China.

Key words: Chicken influenza virus; NS1; Gene expression

关键词: 鸡流感病毒; 非结构蛋白; 基因表达

中图分类号: S852.62

文章标识码: A

文章编号: 1003-5125 (2003) 05-0503-03

由于 H9N2 亚型禽流感对我国的养鸡业已造成了很大的损失, 因而在我国许多养鸡场不得不使用 H9N2 亚型禽流感灭活苗^[1], 但由于灭活苗的使用, 而增加了 H9N2 亚型禽流感的监测难度。因此, 建立一种能区别自然感染鸡和疫苗免疫鸡的鉴别诊断方法已被提到日程上来。

流感病毒的基因组为单股负链 RNA, 含有大小不同的 8 个独立的 RNA 片段, 其第 8 片段为非结构蛋白基因, 编码非结构蛋白 NS1 和 NS2。NS1 蛋白存在于病毒感染的细胞中, 但在毒粒中却检测不到 NS1 蛋白。在细胞感染的早期, 可发现细胞核内有大量的 NS1 蛋白存在, 在感染的晚期, NS1 蛋白可以在细胞浆中出现^[2]。NS1 蛋白可刺激机体产生非结构蛋白抗体。研究表明, 非结构蛋白及其抗体可以作为病毒感染机体的一个重要标记^[3, 4]。已有报道, 可以运用 ELISA 技术检测 NS1 非结构蛋

白抗体来区别流感自然感染鸡与疫苗免疫鸡^[5, 6], 但尚未有应用检测非结构蛋白抗体以鉴别流感自然感染鸡和疫苗免疫鸡的报道。因此, 本研究基于该背景进行了鸡流感病毒 NS1 蛋白基因的克隆与表达, 为以后建立以重组蛋白为包被抗原的 ELISA 技术, 进行 H9N2 亚型禽流感的流行病学调查奠定重要基础。

1 材料与方 法

1.1 病毒

病毒 A / chicken / Beijing / 2 / 97(H9N2)由本教研室分离鉴定保存, 流感病毒 NS1 蛋白单克隆抗体由北海道大学惠送。

1.2 NS1 基因的克隆

用采用酚-氯仿、乙醇沉淀方法自尿囊液中提取 RNA^[7], 用 Uni 12: 5' -AGC AAA AGC AGG-3' 作

收稿日期: 2003-03-17, 修回日期: 2003-04-29

作者简介: 刘金华 (1966-), 男, 山东省冠县籍, 博士, 副教授, 主要从事动物分子病毒学研究。

为反转录引物进行反转录反应,之后按常规法进行 PCR 扩增。上游引物 NSF2: 5' -ACA GAA TTC TAA TGG ATT CCA AC-3', 含有 *EcoR* I 限制性酶切位点; 下游引物 NSR815: 5' -TTA CTC GAG CTG AAA CTA GAA AG-3', 含有 *Xho* I 限制性酶切位点。扩增片段长度为 850bp。扩增程序为: 96°C 预变性 30s, 96°C 变性 30s, 55°C 退火 1min, 72°C 延伸 2min, 进行 30 个循环, 最后 72°C 延伸 5min。PCR 产物经 QIAquick PCR purification Kit 纯化后, 克隆到 pGEM-T Vector 中, 得到重组质粒 pT/NS1。用 *EcoR* I 和 *Xho* I 双酶切质粒 pT/NS1 和表达质粒载体 pET-30(c), 并从凝胶中回收 NS1 片段和载体片段, 然后用 T4 连接酶做连接反应, 连接产物转化于 BL21(DE3) 大肠杆菌感受态细胞中得重组表达质粒 pET/NS1。

1.3 NS1 基因的序列测定

以纯化质粒 pET/NS1 为模板, 以 T7 promoter primer 和 T7 terminator primer 为测序引物, 用 CEQ Dye Terminal Cycle Sequence Quick Start kit 试剂盒进行测序反应, 用 CEQ 2000 Backman Coulter Sequencer(Backman Coulter)全自动测序仪测序。

1.4 NS1 蛋白的表达与鉴定

选择克隆阳性菌落接种于含 30μg/mL 卡那霉素的 LB 培养基中, 37°C 振荡培养至 OD₆₀₀ ≈ 0.5, 加 IPTG 至终浓度为 0.4mmol/L, 继续培养 2.5h, 之后置冰中 5min, 5000r/min 离心 5min, 取沉淀按常规法进行 12% SDS-PAGE 电泳, 观察蛋白表达情况。阳性者留种保存, 并进行 Western-blot 反应, 方法如下: SDS-PAGE 后将凝胶蛋白电转移至 PVDF 膜, 经封闭液封闭后, 与 1:500 稀释的 NS1 单克隆抗体反应 45min, 用含 0.05% Tween-20 的 PBS(PBST) 洗涤 3 次, 再与羊抗鼠 IgG-HRP 酶结合物室温反应 1h, PBST 充分洗涤后, 浸入底物显色液中, 观察颜色区带。

2 结果

2.1 NS1 基因的 PCR 扩增与克隆鉴定

在本试验中所扩增片段为 850bp, 琼脂糖凝胶电泳检测证实, 扩增片段大小约 850bp, 结果与预期一致。扩增片段纯化后, 与 pGEM-T vector 连接得到重组质粒 pT/NS1。用 *EcoR* I 和 *Xho* I 双酶切质粒 pT/NS1 和表达载体 pET-30(c) 并从凝胶中回收 NS1 片段和表达载体, 经连接后, 得到重组表达载体 pET/NS1, 经 *EcoR* I 和 *Xho* I 双酶切, 验证 NS1 片段插入到 pET-30(c) 中, 见图 1。

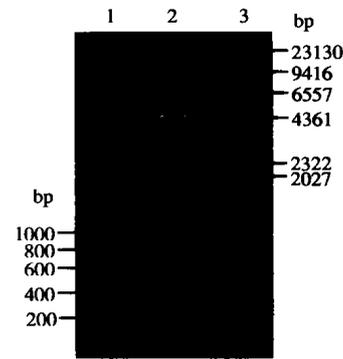


图 1 酶切鉴定

Fig.1 Analysis of pET/NS1

1, DNA Marker; 2, pET/NS1(*EcoR* I+*Xho* I); 3, Marker λ /*Hind* III.

序列测定结果证明插入片段与载体的连接部位的可读框正确, 通过与 GenBank 中的流感病毒 NS1 基因序列分析比较, 发现本实验所克隆的 NS1 基因与 GenBank 中的 A/chicken/Beijing/1/94 的 NS1 基因序列同源率为 97.9%。

2.2 NS1 基因表达产物的 SDS-PAGE

SDS-PAGE 结果表明, 含 pET/NS1 重组质粒的 BL21(DE3) 大肠杆菌经 0.4mmol/L IPTG 诱导后有预期的蛋白表达, 其分子量约为 30kDa, 见图 2A; 而未加 IPTG 的对照样本则没有预期蛋白表达。该蛋白为融合蛋白, 含有 6 个连续组氨酸。

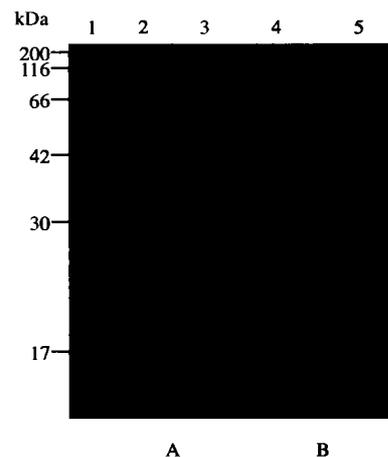


图 2 NS1 基因在 BL21(DE3) 中的表达产物分析

Fig.2 Analysis of NS1 gene expression product in BL21 (DE3)
A, DSD-PAGE analysis: 1, Protein marker; 2, BL21 without IPTG induction; 3, BL21 with IPTG induction. B, Western-blot analysis: 4, BL21 with IPTG induction; 5, BL21 without IPTG induction.

2.3 表达蛋白的特异性鉴定

为了验证 30kDa 的蛋白带是否由 NS1 基因表达, 我们用 Western-blot 法进行了表达产物特异性检测, 结果如图 2B 所示, IPTG 诱导样本有特异条

带,而未加 IPTG 诱导的大肠杆菌未见特异条带,证明该 30kDa 蛋白带系 NS1 基因表达产物。

3 讨论

禽流感的监测工作是预防与控制禽流感的一个关键环节,然而在我国由于 H9N2 亚型禽流感灭活苗的普遍使用,使得监测工作又无法应用常规检测结构蛋白的 HI、ELISA 方法区别疫苗免疫抗体和自然感染抗体。因为没有有效的方法区别疫苗免疫抗体和自然感染抗体,所以在世界上不少国家禁止应用流感疫苗,一旦检测阳性者,随即进行销毁处理。临床实践表明, H9N2 亚型禽流感灭活苗的使用对控制我国 H9N2 禽流感的发生起到了重要作用,但如何进行 H9N2 亚型禽流感的监测又是一道难题。因此,结合分子生物学技术手段,建立一种实用、敏感的鉴别诊断方法已成为当务之急。本研究以此为出发点,克隆和表达了 H9N2 流感病毒的 NS1 基因, SDS-PAGE 检测表明 NS1 基因在大肠杆菌 BL21(3E)中得到了高效表达并且与预期大小一致, Western-blot 试验表明用大肠杆菌表达的重组蛋白可以与流感病毒的 NS1 蛋白单克隆抗体反应。

现有的研究表明,非结构蛋白可以作为乙肝病毒^[3]、口蹄疫病毒^[4]及马流感病毒^[5,6]感染的一个重要标记。由于 NS1 基因具有高度的保守性,尤为对我国 H9N2 亚型禽流感病毒,其 NS 基因全部位于一个进化分支(待发表资料)。因此,该蛋白的正确

表达为今后建立以重组蛋白作为包被抗原 ELISA 及制备试剂盒奠定了基础,为将来有效地进行禽流感的监测工作迈出了关键一步,进一步的试验及临床样本检测正在进行中。

参考文献

- [1] 甘孟侯. 禽流感[M]. 第二版, 北京: 中国农业出版社, 2002.
- [2] Skehel J J. Polypeptid synthesis in influenza virus-infected cells[J]. Virology, 1972, 49:23-36.
- [3] Inoue Y, Suzuki R, Matsuura Y, *et al.* Expression of the amino-terminal half of the NS1 region of the hepatitis C virus genome and detection and antibody to the expressed protein in patients with liver disease[J]. J Gen Virol, 1992, 73: 2151-2154.
- [4] Nietzert E, Beck E, Ke Mello P A, *et al.* Expression of the aphthovirus RNA polymerase gene in Escherichia coli and its use with other bioengineered nonstructural antigens in detection of late persistent infection[J]. Virology, 1991, 184: 799-804.
- [5] Ozaki H, Sugiura T, Sugita S, *et al.* Detection of antibodies to the nonstructural protein (NS1) of influenza A virus allows distinction between vaccinated and infected horses[J]. Vet Microbiol, 2001, 82:111-119.
- [6] Birch-Machin I, Rowan A, Pich J, *et al.* Expression of the nonstructural protein NS1 of equine influenza A virus: detection of anti-NS1 antibody in infection equine sera[J]. J Virol Method, 1997, 65: 255-263.
- [7] Bean W J, Sriram G, Webster R G. Electrophoretic analysis of iodine-labeled influenza virus RNA segments[J]. Anal Biochem, 1980, 102: 228-232.