维普资讯 http://www.cqvip.com

第19卷5期
2004年10月

中国病毒学
VIROLOGICA SINICA

19（5）：449-453
October 2004

流感病毒 *ns1* 基因的克隆及其原核表达载体的构建*

张志珍[1,2]，洪文珊[1]，李康生[1**]

(1. 汕头大学医学院-香港大学医学院联合流感研究中心，汕头大学医学院微生物学与免疫学教研室，广东汕头 515031；2. 山西大学生命科学与技术学院，山西太原 030006)

Cloning and Construction of Prokaryotic Expression Vector of *ns1* Gene of Influenza A Virus

ZHANG Zhi-zhen[1,2]，HONG Wen-shan[1]，LI Kang-sheng[1**]

(1. Joint Influenza Research Centre (SUMC & HKU), Department of Microbiology and Immunology, Shantou University Medical College, Shantou 515031, China; 2. College of Life Science and Technology, Shanxi University, Taiyuan 030006, China)

Abstract: To understand the characteristics of the *ns1* gene of Avian influenza A virus H5N1 and to prepare NS1 protein in scale, viruses were cultivated in embryonated hen eggs and virion RNA was extracted from allantoic fluid. The complete *ns* gene was amplified by RT-PCR and analyzed. Sequence analysis demonstrated that the NS1 cDNA contained one open reading frame of 678 bp, which encoded a polypeptide of 225 amino acids. The *ns1* gene of Qa/ST/852/01 (H5N1) isolate was closer to that of some H5N1 strains prevalent in southern China in recent years, the homologies of nucleotide and amino acid sequences were 99.0%～97.5% and 99.1%～97.8%, respectively. Subsequently, *ns1* cDNA was obtained by PCR and cloned into pGEX-4T-3 vector to construct recombinant plasmid pGEX-4T-3/NS1 cDNA, and expressed in BL21(DE3) *E.coli* strain. SDS-PAGE and scan analysis showed recombinant fusion protein GST-NS1 was expressed in soluble form, and fusion protein amounted to 28.5% of the total soluble bacterial protein. The protein was purified by affinity chromatography and the purity was greater than 96%. Western blot analysis of recombinant fusion protein confirmed it could be specifically recognized by antibody of GST. Construction of the prokaryotic expression vector provided a foundation for further studying the function of NS1 protein and preparation of NS1 antibody.

Key words: Avian influenza A virus; *ns1* gene; Sequence analysis; Cloning; Induction expression

摘要：为了解H5N1亚型流感病毒株的*ns1*基因特性及其规模制备NS1蛋白，首先将病毒在鸡胚中传代，从收获的尿囊液中提取RNA，采用RT-PCR技术扩增流感病毒全长*ns*基因。测序显示H5N1亚型流感病毒NS1 cDNA全长678bp，编码225个氨基酸。BLAST分析表明，Qa/ST/852/01 (H5N1)病毒株*ns1*基因与近年来从华南地区分离的禽H5N1毒株的*ns1*基因有很高的同源性。之后采用PCR方法扩增*ns1*基因的cDNA片段，将其克隆到pGEX-4T-3载体中，与谷胱甘肽巯基转移酶(GST)基因融合，构建重组质粒pGEX-4T-3/NS1 cDNA，转化大肠杆菌BL21(DE3)并进行诱导表达。SDS-PAGE和凝胶扫描分析，GST-NS1融合蛋白在大肠杆菌中获得了高效表达，并且以可溶形式存在，重组融合蛋白的表达量占菌体总蛋白的28.5%，表达产物经亲和层析纯化后蛋白质纯度达96%以上。经免疫印记证实重组融合蛋白可以被GST特异性抗体所识别。该表达载体的构建为获得大量NS1蛋白进行功能研究及抗体制备提供了基础。

关键词：流感病毒；*ns1*基因；序列分析；克隆；诱导表达

中图分类号：R511　　**文献标识码**：A　　**文章编号**：1003-5125(2004)05-0449-05

甲型流感病毒基因组由8个分节段的负链RNA组成，共编码10种蛋白，其中在病毒复制早期即有非结构蛋白NS1的大量表达，NS1蛋白在病毒感染的细胞中含量丰富，提示NS1蛋白在病毒复

收稿日期：2004-04-19，修回日期：2004-05-31
* 基金项目：世界卫生组织资助项目(HQ/01/144185)；中国博士后科学基金(2003034460)
作者简介：张志珍(1967-),女,山西籍,副教授,博士,主要从事流感病毒分子生物学研究。
** 通讯作者. Corresponding author. Tel：0754-8900456，E-mail：ksli@stu.edu.cn

维普资讯 http://www.cqvip.c

制及病毒早期抵抗机体的抗病毒免疫应答过程中具有重要作用[1,2]。NS1 蛋白由病毒 RNA 第 8 节段 NS 基因编码，分子量在 22～26kDa 之间[3]。流感病毒 NS1 蛋白有两个比较重要的功能区：A 区为氨基端的 RNA 结合区，NS1 蛋白可通过此区与不同种类的 RNA 相结合；B 区为分子羧基端的效应区，此区可与宿主细胞核蛋白相互作用，抑制细胞核 mRMA 的运输[4,5]。

在病毒感染早期，干扰素-α/β(IFN-α/β)及肿瘤坏死因子-α/β(TNF-α/β)等细胞因子即被诱导产生并在机体抗病毒过程中发挥重要功能。早期反向遗传系统(reverse-genetics system)实验证实了 NS1 蛋白在保护流感病毒抵抗细胞 IFN-α/β 反应中的作用，当缺乏 *ns1* 基因时，流感病毒仅能在细胞 IFN 反应缺陷时复制[6,7]。在病毒感染期间，NS1 蛋白的氨基端通过与双链 RNA(dsRNA)结合来拮抗 IFN-α/β 对蛋白合成的抑制作用，以增强病毒蛋白的合成[8,9]。更多研究显示，NS1 蛋白能使流感病毒逃避宿主细胞的免疫防御，在抑制 IFN-α/β 及 TNF-α/β 介导的抗病毒反应中起重要作用，在流感大流行中具有潜在的重要性[10,11]。目前，对 NS1 蛋白的功能研究主要集中在人流感病毒，针对禽流感病毒 NS1 蛋白拮抗机体抗病毒免疫应答的研究颇少，而近年来禽流感病毒多次感染人的事件已提醒我们，必须重视对禽流感病毒的研究。为此，我们在完成对华南地区部分禽流感病毒 *ns1* 基因特性的研究基础上[12]，进一步选取 A/Quail/Shantou/852/01(H5N1)禽流感病毒株作为研究材料，对其 *ns1* 的基因特性进行分析，并构建含 NS1 cDNA 的原核表达载体来高效表达 GST-NS1 融合蛋白，旨在为对 NS1 蛋白的功能进行深入研究和 NS1 抗体的制备打下基础。

1 材料与方法

1.1 材料

病毒标本采集、流感病毒分离及鉴定由本中心完成，各种亚型流感病毒的标准抗血清由 Dr. Webster RG 提供。

pMD 18-T 载体购自 TaKaRa 公司，表达载体 pGEX-4T-3 购于 Pharmacia Biotech 公司；大肠杆菌 DH5α、BL21(DE3)由本室保存；GST 抗体购自 Pharmacia Biotech 公司。

QIAamp 病毒 RNA 提取试剂盒购自 Qiagen 公司，SuperScript 逆转录酶、DTT 购自 Invitrogen 公司，AmpliTaq Gold 酶、dNTP、$MgCl_2$ 购自 Roche 公司；限制性内切酶 *Eco*RⅠ、*Xho*Ⅰ及 T4 DNA 连接酶购自 New England Biolabs 公司；胰蛋白胨、酵母提取物购于 Oxid 公司，琼脂糖、生物琼脂购自 Sigma 公司，Glutathione Sepharose 4B 购自 Pharmacia Biotech 公司；质粒提取、凝胶回收试剂盒购自上海华舜生物工程公司，其他试剂为国产分析纯。

1.2 病毒分离与鉴定

将采集标本经双抗处理后接种 9～10 日龄鸡胚尿囊腔，35℃培养 72h，收获尿囊液进行红细胞凝集实验，血凝阳性（AD≥16）且细菌培养阴性者-80℃保存。阳性标本进一步用 WHO 推荐的全套流感病毒亚型的标准抗血清进行亚型鉴定，按常规方法操作[13]。

1.3 病毒 RNA 的提取和纯化

将选取的禽流感病毒 A/Quail/Shantou/852/01 (H5N1)（缩写：Qa/ST/852/01）接种 9～10 日龄鸡胚尿囊腔进行增殖，取 140μL 含流感病毒的鸡胚尿囊腔上清，按 RNeasy RNA 提取试剂盒说明书提取和纯化病毒 RNA，最后溶于 50μL DEPC-H_2O。

1.4 *ns* 基因 RT-PCR 扩增

ns 基因逆转录引物：5'-AGCAAAAGCAGG-3' (12nt)；上游引物：5′-AGCAAAAGCAGGGTGACAAA-3' (20nt)；下游引物：5'-AGTAGAAACAAGGGTGTTTT-3′ (20nt)。反应条件和循环参数详见参考文献[12,14]。1.2%琼脂糖凝胶电泳观察结果。

1.5 *ns* 基因片段的克隆、鉴定与测序

RT-PCR 产物经琼脂糖凝胶电泳，用胶回收试剂盒进行纯化。将纯化的 RT-PCR 产物与 pMD 18-T 载体连接，转化大肠杆菌 DH5α，经含 Amp、X-gal 和 IPTG 的 LB 平板筛选后，用 PCR 方法对重组质粒进行鉴定，筛选出含有正确插入片段的重组质粒，用自动测序仪进行序列测定。测序结果的序列拼接、校正和分析使用了 DNA Club、Primer Premier 5 及基于 Internet 上的 BLAST 分析软件。

1.6 *ns1* 基因 cDNA 片段的扩增

根据测定的 *ns1* 基因 cDNA ORF 序列，设计扩增 NS1 cDNA 的一对引物，P1：5′-CC***GAATTC***CATGGATTCCAACA-3' (22nt)，P2：5'-AT***CTCGAG***TCAAACTTCTGACT-3′ (22nt)。在上游引物的 5′端设计了 *Eco*RⅠ酶切位点，在下游引物的 5′端设计了 *Xho*Ⅰ酶切位点。以上述扩增的 RT-PCR 产物为模板，热启动法进行 PCR：94℃预变性 3min；94℃ 40s，55℃ 40s，72℃ 1min，30 个循环；72℃延长 8min。1.2%琼脂糖凝胶电泳观察结果。

1.7 *ns1* 基因 cDNA 原核表达载体的构建

维普资讯 http://www.cqvip.com

琼脂糖凝胶电泳回收上述 PCR 产物，经 *Eco*R Ⅰ和 *Xho* Ⅰ双酶切后，与双酶切的 pGEX-4T-3 载体在 T4 连接酶作用下 16℃连接 12h，构建 pGEX-4T-3/NS1 cDNA 原核表达载体，转化宿主菌 BL21 (DE3)，双酶切鉴定和 DNA 序列测定筛选出阳性克隆。

1.8 融合蛋白 GST-NS1 的诱导表达

挑取含有 pGEX-4T-3/NS1 cDNA 的阳性克隆接种于 5mL 2×YT-G 中过夜培养，次日，按 1∶100 转接扩大培养至 OD_{600} 为 1～2h，加入异丙基-β-D-硫代半乳糖苷（IPTG）至终浓度 0.3mmol/L，37℃诱导表达 4h。每隔 1h 取样，离心收集菌体，用预冷的 PBS 液重悬，100℃加热 3min，取上清以 12%SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳（SDS-PAGE）分析表达结果[15]。

1.9 融合蛋白 GST-NS1 的纯化

将 10g 菌体溶于 100mL PBS，冰浴中超声破碎，加入 20%Triton X-100 至终浓度 1%，室温静置 30min，15 000g 离心 20min，取上清液与 Glutathione Sepharose 4B 混合，按 GST 融合表达系统手册纯化 GST-NS1 融合蛋白，用 SDS-PAGE 进行纯度鉴定。

1.10 免疫印迹分析

用小鼠抗 GST 单克隆抗体作一抗，辣根过氧化物酶标记的山羊抗小鼠 IgG 作二抗进行免疫印迹分析，具体方法参考文献[15]。

2 结果

2.1 流感病毒 *ns* 基因的克隆与序列测定

以提取病毒株 Qa/ST/852/01 的 RNA 为模板，用所设计的引物进行 RT-PCR 扩增，产物经 1.2%琼脂糖凝胶电泳分析，在 865bp 处出现特异性条带，大小与预期结果相符。将 RT-PCR 产物纯化后，克隆入 pMD 18-T 载体，转化大肠杆菌 DH5α，经含 Amp、X-gal 和 IPTG 的 LB 平板筛选后，对重组质粒进行序列测定。测序结果表明，采用我们所设计的引物能特异地扩增出禽流感病毒株 Qa/ST/852/01 的 NS 基因全序列。NS 基因全长 865bp，包含一个完整 ORF，NS1 cDNA 长度为 678bp，编码 225 个氨基酸（测序图谱省略）。

2.2 NS1 cDNA 核苷酸序列及氨基酸序列分析

BLAST 分析表明，Qa/ST/852/01 病毒株的 NS1 cDNA 核苷酸序列与我们在 2000～2003 年间分离的禽流感病毒 H5N1 亚型 NS1 cDNA 核苷酸序列的同源性在 99.0%～97.5%之间，推导的氨基酸序列的同源性在 99.1%～97.8%之间。将 NS1 cDNA 核苷酸序列及推导的氨基酸序列与 A/HongKong/156/97 (H5N1)毒株（缩写：HK/156/97）（序列号：AF036360）及 GenBank 登录的 1997～2000 年间禽 H5N1 亚型病毒株的 NS1 序列进行 BLAST 比较分析，发现 Qa/ST/852/01 病毒株 NS1 cDNA 除在第 238～252 位存在 15 个核苷酸的缺失外，二者之间核苷酸序列的同源性为 95%，推导的氨基酸序列的同源性也在 95%以上。

2.3 重组质粒的筛选及鉴定

PCR 产物凝胶电泳显示，在 678bp 处出现单一条带。将 PCR 产物用 *Eco*R Ⅰ和 *Xho* Ⅰ双酶切后，定向插入同样经双酶切的 pGEX-4T-3 载体中，获得重组质粒 pGEX-4T-3/NS1 cDNA。*Eco*R Ⅰ、*Xho* Ⅰ双酶切和 DNA 序列测定对重组质粒进行鉴定，筛选出具有 NS1 基因 cDNA 正向插入且与 GST 之间读码框架正确的重组质粒，酶切鉴定结果见图 1。

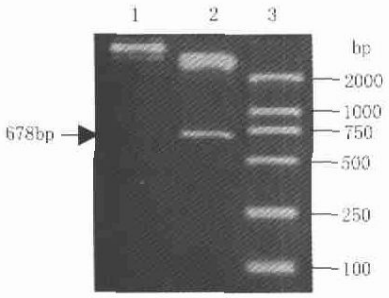

图 1 重组质粒 pGEX-4T-3/NS1 cDNA 的酶切鉴定

Fig.1 Identification of recombinant plasmid pGEX-4T-3/NS1 cDNA

1, Plasmid pGEX-4T-3/NS1 cDNA; 2,pGEX-4T-3/NS1 cDNA digested by *Eco*R Ⅰ and *Xho* Ⅰ; 3, DL2000 marker.

2.4 融合蛋白在大肠杆菌中的诱导表达

含 pGEX-4T-3/NS1 cDNA 的 BL21（DE3）用 IPTG 诱导表达 4h 后，SDS-PAGE 分析显示（图 2），与诱导前相比，在相对分子质量约 43.0kDa 处出现明显的诱导蛋白条带，分子质量大小与预期一致。凝胶扫描分析，最佳表达状态时融合蛋白的表达量占菌体总蛋白的 28.5%。

2.5 融合蛋白的纯化及免疫印迹分析

菌体经超声破碎后，其上清液用 Glutathione Sepharose 4B 亲和层析纯化，SDS-PAGE 分析表明，重组融合蛋白 GST-NS1 以可溶形式被诱导表达，亲和层析纯化后 GST-NS1 的纯度大于 96%（图 3A）。纯化的融合蛋白经 12%SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳、电转移后，用小鼠抗 GST 单克隆抗体作一抗进行免疫印迹分析，出现一条阳性反应带（图 3B）。

3 讨论

1997 年在我国香港特区高致病性禽流感病毒

维普资讯 http://www.cqvip.com

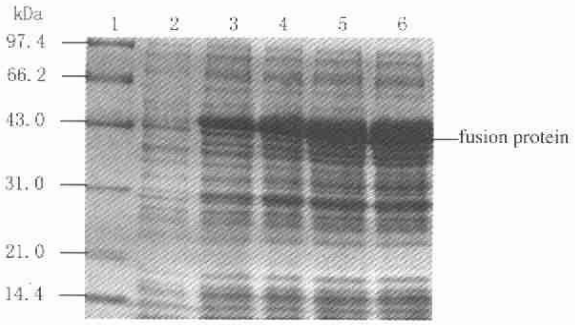

图2 融合蛋白GST-NS1的SDS-PAGE分析

Fig.2 SDS-PAGE analysis of the expression of fusion protein GST-NS1

1, Protein MW marker; 2, BL21(DE3) cell lysate before IPTG induction; 3-6, BL21(DE3) cell lysate after IPTG induction for 1-4h respectively.

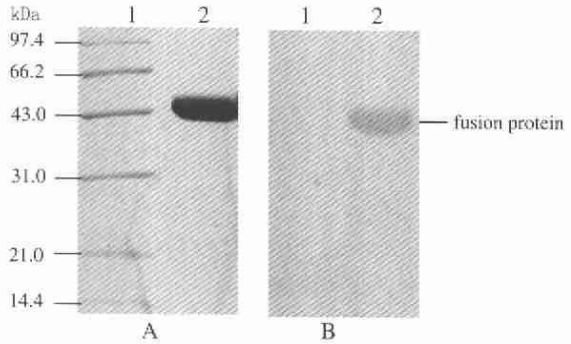

图3 亲和层析纯化后GST-NS1的分析

Fig.3 Analysis of the purified GST-NS1

A: SDS-PAGE, B: Western blot. 1, Protein MW marker; 2, Purified GST-NS1 by affinity chromatography.

Hong Kong/156/97(H5N1)直接从鸡传至人，引起18人感染，其中6人死亡[16]，这是世界上首次证实禽流感病毒H5N1感染人类。之后，相继有禽流感病毒H9N2、H7N7亚型感染人类和H5N1再次感染人类的报道。禽流感病毒是如何拮抗机体的抗病毒免疫应答，逃避机体的免疫防御直接造成流感流行呢？Seo等[17]研究发现，HK/156/97毒株逃避机体的免疫防御与其NS1蛋白抵抗IFN-α/β及TNF-β介导的抗病毒反应有关；Basler等[18]研究也发现，1918年西班牙流感A/Brevig Mission/1/18 (H1N1)株的NS1蛋白与机体细胞因子之间的相互作用对病毒的致病性起重要作用。

绝大多数甲型流感病毒NS基因由890个核苷酸组成，编码230个氨基酸。我们测定了2000～2003年间在华南地区分离的部分禽流感病毒H5N1亚型的NS基因核苷酸序列，结果表明NS基因全长865 bp，编码225个氨基酸。在此研究基础上，我们选取遗传背景清楚的禽流感病毒Qa/ST/852/01 (H5N1)作为研究材料，首先对其NS基因的特性进行分析，研究结果显示我们分离的Qa/ST/852/01病毒株NS基因全长为865bp，NS1基因cDNA ORF长度为678bp，编码225个氨基酸。与我们在华南地区分离的H5N1亚型禽流感病毒的NS1 cDNA核苷酸序列的同源性在99.0%～97.5%之间，氨基酸序列的同源性在99.1%～97.8%之间。将NS1基因推导的氨基酸序列与HK/156/97毒株的NS1蛋白氨基酸序列进行BLAST比较分析，发现Qa/ST/852/01病毒株NS1蛋白在氨基端第80位存在5个氨基酸残基的缺失，二者之间其它部位氨基酸序列的同源性在95%以上，这些氨基酸片段的缺失和突变对NS1蛋白功能具有怎样的影响？是否与H5N1亚型禽流感病毒逃避机体的免疫防御直接感染人有关？为此，我们进一步构建了NS1基因的原核表达载体，并对NS1融合蛋白进行初步诱导表达，该结果为今后研究NS1蛋白的不同功能域在拮抗机体抗病毒免疫应答中的作用奠定了基础。

若要在真核转染条件下研究NS1蛋白的功能，就需要NS1蛋白特异性的抗体来对其在细胞中的表达水平进行检测。因此，本研究构建NS1基因cDNA原核表达载体的另一目的是制备NS1抗体，我们拟采用pGEX系统来表达融合蛋白作为抗原以刺激机体产生抗体。pGEX-4T-3融合表达系统含有强启动子tac及lac操纵基因SD序列、Lac I阻遏蛋白基因等。pGEX-4T-3的SD序列下游就是GST基因，外源基因在GST基因下游的多克隆位点(MCS)上插入，高效表达的融合蛋白可用glutathione sepharose 4B亲和层析纯化。我们的研究结果表明，融合蛋白GST-NS1以可溶形式被诱导表达，其表达量占菌体总的可溶性蛋白的28.5%，亲和层析纯化的效率在80%以上，融合蛋白的纯度大于96%。重组融合蛋白的获得为进一步研究NS1蛋白在流感大流行中的作用及制备NS1蛋白抗体打下了基础。

参考文献

[1] Krug R M, Yuan W M, Noath D L, *et al*. Intracelluar warfare between human influenza viruses and human cells: the roles of the NS1 protein[J]. Virology, 2003, 309(2): 181-189.

[2] Noah D L, Twu K Y, Krug R M. Cellular antiviral responses against influenza A virus are countered at the posttranscriptional level by the viral NS1A protein via its binding to a cellular protein required for the 3'end processing of cellular pre-mRNAs[J]. Virology, 2003, 307 (2): 386-395.

[3] Lamb R A, Krug R M. Orthomyxoviridae: *the viruses and their* replication. In: Knipe D M, Howley P M, ed. Fields Virology[M],

维普资讯 http://www.cqvip.c

4ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkin, 2001. 1487-1532.

[4] Yuan W, Aramini J M, Montelione G T, *et al.* Structural basis for ubiquitin-like ISG15 protein binding to the NS1 protein of influenza B virus: a protein-protein interaction function that is not shared by the corresponding N-terminal domain of the NS1 protein of influenza A virus[J]. Virology, 2002, 304(2): 291-301.

[5] Chien C Y, Xu Y, Xiao R, *et al.* Biophysical characterization of the complex between double-stranded RNA and the N-terminal domain of the NS1 protein from influenza A virus: evidence for a novel RNA-binding mode[J]. Biochemistry, 2004, 43(7): 1950-1962.

[6] Garcia-Sastre A, Egorov A, Matassov D, *et al.* Influenza A virus lacking the NS1 gene replicates in interferon-deficient systems[J]. Virology, 1998, 252 (2): 324-330.

[7] Hatada E, Fukuda R, Saito S. Mutant influenza A virus with a defective NS1 protein cannot block the activation of PKR in infected cells[J]. J Virol, 1999, 73(5): 2425-2433.

[8] Salvatore M, Basler C F, Parisien J P, *et al.* Effects of influenza A virus NS1 protein on protein expression: the NS1 protein enhances translation and is not required for shutoff of host protein synthesis[J]. J Virol, 2002, 76(3): 1206-1212.

[9] Wang X Y, Basler C F, Williams-Bryan R G, *et al.* Functional replacement of the carboxy-terminal two-thirds of the influenza A virus NS1 protein with short heterologous dimerization domains[J]. J Virol, 2002, 76(24): 12951-12962.

[10] Geiss G K, Salvatore M, Tumpey T M, *et al.* Cellular transcriptional profiling in influenza A virus-infected lung epithelial cells: The role of the nonstructural NS1 protein in the evasion of the host innate defense and its potential contribution to pandemic influenza[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2002, 99(16): 10736-10741.

[11] Seo S H, Webster R G. Tumor necrosis factor alpha exerts powerful anti-influenza virus effects in lung epithelial cells[J]. J Virol, 2002, 76(3): 1071-1076.

[12] 张志珍，段 炼，李康生. 华南流感病毒 NS1 基因特性研究[J]. 生物化学与生物物理进展, 2004, 31(3):237-243.

[13] 郭元吉，程小雯. 流行性感冒病毒及其实验技术[M]. 北京：三峡出版社, 1997. 87-119.

[14] Li K S, Xu K M, Peiris J S M, *et al.* Characterization of H9 subtype influenza viruses from the ducks of southern China: a candidate for the next influenza pandemic in human?[J]. J Virol, 2003, 77(12): 6988-6994.

[15] 奥斯伯 F，布伦特 R，金斯顿 R E，等. 精编分子生物学指南[M]. 北京：科学出版社, 1998. 333-369.

[16] Subbarao K, Klimov A, Kata J, *et al.* Characterization of an avian influenza virus (H5N1) isolated from a child with a fatal respiratory illness[J]. Science, 1998, 279(5349): 393-396.

[17] Seo S H, Hoffmann E, Webster R G, *et al.* Lethal H5N1 influenza viruses escape host anti-viral cytokine responses[J]. Nat Med, 2002, 8(9): 950-954.

[18] Basler C F, Reid A H, Dybing J K, *et al.* Sequence of the pandemic influenza virus nonstructural gene (NS) segment and characterization of recombinant viruses bearing the 1918 NS gene[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2001, 98(5): 2746-2751.