

乙型脑炎病毒 NS1 蛋白的可溶性表达与抗原性分析

刘立科^{1,2}, 陈振师^{1,2}, 任玉红¹, 步志高², 华荣虹²

(1. 河北农业大学 动物科技学院, 河北 保定 071001; 2. 中国农业科学院 哈尔滨兽医研究所 兽医生物技术国家重点实验室, 哈尔滨 150001)

中图分类号: S852.65

文献标识码: A

文章编号: 1004-7034(2012)01-0017-03

关键词: 乙型脑炎病毒; NS1 蛋白; 原核表达

摘要: 为获得可溶性表达的乙型脑炎病毒(JEV) NS1 蛋白, 将编码 JEV SA14-14-2 株 NS1 蛋白基因克隆至原核表达载体 pMAL-c5X 中, 构建重组融合表达质粒 pc5X-NS1; 用重组质粒转化宿主菌 ER2523 后, 经 IPTG 诱导得到可溶性的融合蛋白 MBP-NS1; 优化诱导表达条件, 于 28℃、0.3 mmol/L IPTG 诱导 4 h; 最后融合蛋白经直链淀粉树脂柱纯化。结果表明: 重组融合蛋白 MBP-NS1 具有良好的抗原性和特异性。

Soluble expression and antigenic analysis of NS1 protein of Japanese encephalitis virus

LIU Li-ke^{1,2}, CHEN Zhen-shi^{1,2}, REN Yu-hong¹, BU Zhi-gao², HUA Rong-hong²

(1. College of Animal Science and Technology, Hebei Agricultural University, Baoding 071001, China;

2. State Key Laboratory of Veterinary Biotechnology, Harbin Veterinary Research Institute, Chinese

Academy of Agricultural Sciences, Harbin 150001, China)

Key words: Japanese encephalitis virus; NS1 protein; prokaryotic expression

Abstract: To obtain the expression of NS1 protein of Japanese encephalitis virus in a soluble form, the NS1 gene of JEV strain SA14-14-2 was cloned into the expression vector pMAL-c5X, then the recombinant plasmid pc5X-NS1 was confirmed by sequencing. After the recombinant plasmid was transformed into host bacteria ER2523, the fusion protein MBP-NS1 was expressed in the soluble form and purified by induced by isopropyl beta-D-thiogalactopyranoside (IPTG), then the expression conditions were further optimized. Western-blot and indirect ELISA analysis showed that the recombinant fusion protein MBP-NS1 could be specific reactive with antibodies against JEV. This work can provide an important basis for further study on NS1 protein of Japanese encephalitis virus.

乙型脑炎是由乙型脑炎病毒(JEV)引起的以中枢神经系统损害为主的虫媒性人畜共患病。乙型脑炎病毒属于黄病毒科黄病毒属单股正链 RNA 病毒。乙型脑炎分布于东南亚各地区, 且流行区域有扩大的趋势。在全球每年有 30 000~50 000 例乙脑病例, 超过 10 000 人死亡^[1], 而我国是乙脑发病人数最多的国家, 占世界总发病人数的 80% 以上^[2], 一半幸存者中有严重的神经和精神后遗症。猪是 JEV 的主要感染对象, 种猪感染病毒后表现为繁殖障碍, 严重影响养猪业的健康发展, 具有重要的公共卫生学意义。

NS1 蛋白是乙型脑炎病毒的一种非结构蛋白。NS1 蛋白抗体没有中和活性和血凝抑制活性, 但它具有可溶性补体结合活性, 可在不出现中和抗体的情况下诱生保护力, 这种保护作用依赖于抗体的 Fc 片段^[3]。无论是主动免疫 NS1 蛋白, 还是被动免疫 NS1 蛋白的特异性抗体, 均能对接受致死量的病毒攻击试验动物产生保护性免疫。因此, NS1 蛋白具有使宿主产生保护性免疫而没有抗体依赖性增强感染作用^[4]。据此, 国外已经利用 NS1 蛋白进行 JEV 亚单位疫苗的研制, 并开展对 JEV 诊断和监测的研究, 但国内对该蛋白的相关研究报道较少。研究构建了表达 NS1 基因的重组表达质粒, 表达的可溶性融合蛋白 MBP-NS1 具有良好的抗原性和特异性。

1 材料和方法

1.1 质粒、菌种与血清

DH5 α 、ER2523 感受态细胞, 由哈尔滨兽医研究所兽医生物技术国家重点实验室制备并保存; 含编码

收稿日期: 2011-03-04; 修回日期: 2011-04-07

基金项目: 国家自然科学基金项目(30700027); 国家公益性行业科研专项项目(200803015)

作者简介: 刘立科(1984-), 男, 硕士研究生。

通信作者: 华荣虹(1976-), 男, 副研究员, 博士, huaronghong@163.com。

JEV NS1 蛋白基因序列的质粒 pET30 - opti - JEV - NS1(未发表),由哈尔滨兽医研究所乙型脑炎研究组构建并保存;猪抗 JEV 阳性血清及鼠抗 JEV 阳性血清,由哈尔滨兽医研究所乙型脑炎研究组收集并保存。

1.2 主要试剂

pMAL 融合蛋白表达与纯化试剂盒,购自 NEB 公司; Ex Taq DNA 聚合酶、T4 DNA 连接酶、限制性内切酶,购自宝生物工程(大连)有限公司;质粒 DNA 小量试剂盒、胶回收(小量)试剂盒,购自上海华舜生物工程有限公司;山羊抗鼠辣根过氧化物酶标记的 IgG,购自北京中杉金桥生物技术有限公司。

1.3 NS1 融合蛋白重组表达质粒的构建

用 BamH I 与 Xho I 双酶切质粒 pET30 - opti - JEV - NS1,回收大小约为 1 200 bp 的 DNA 片段,同样用 Xho I 和 BamH I 双酶切表达载体 pMAL - c5X。回收后的 NS1 基因与酶切处理的 pMAL - c5X 载体用 T4 DNA 连接酶连接并转化 DH5 α 感受态细胞。提取重组质粒 pc5X - NS1,用 BamH I 与 Xho I 双酶切鉴定,将阳性质粒送南京金斯瑞生物公司测序验证。

1.4 重组融合蛋白的诱导表达与 SDS - PAGE 分析

用经鉴定正确的阳性质粒 pc5X - NS1 转化 ER2523 感受态细胞,挑取单个菌落,接种于 5 mL 含有氨苄西林(100 μ g/mL)的 LB 液体培养基中,37 $^{\circ}$ C 培养过夜。按照 1:100 比例接种于新鲜 LB 培养基中,37 $^{\circ}$ C 振荡培养至 OD₆₀₀ 值约为 0.5 时,加 IPTG 至终浓度为 0.3 mmol/L,分别于 28 $^{\circ}$ C、33 $^{\circ}$ C、37 $^{\circ}$ C 诱导 4 h,培养物离心后用 1/20 体积 PBS 重悬,超声波裂解后 12 000 r/min 离心分离上清液和沉淀;对上述样品进行 SDS - PAGE 分析;同时对 pMAL - c5X 空载体进行同样的操作并作为对照。

1.5 MBP - NS1 纯化重组菌的诱导表达

按照 pMAL 融合蛋白表达及纯化试剂盒说明书操作,利用直链淀粉树脂柱对融合表达的 MBP - NS1 进行纯化,测定纯化蛋白含量,冻存,备用。

1.6 重组蛋白的 Western - blot 分析

诱导表达的菌经 SDS - PAGE 电泳后进行电转印,转印后的硝酸纤维素膜用含 5% 脱脂奶粉的 PBS 封闭液于 4 $^{\circ}$ C 封闭过夜;在以 1:200 稀释的 JEV 小鼠阳性血清中室温作用 1 h;用 PBST(含 0.5 mL/L 吐温 - 20 的 pH 值为 7.4 的 PBS)洗涤 5 次,再与 1:15 000 稀释的红外染料标记的山羊抗鼠辣根过氧化物酶标记的 IgG 抗体室温作用 1 h;避光条件下用 PBST 洗涤 5 次,同样在避光条件下用 PBS 再洗涤 2 次,用 Odyssey 扫描仪扫描。

1.7 间接 ELISA 方法的建立

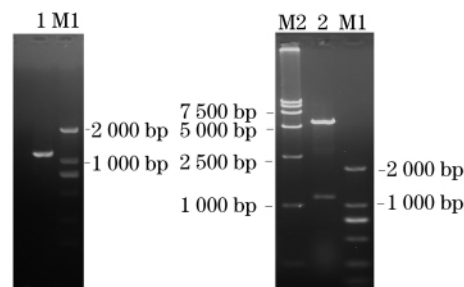
在酶标板上用包被液将 NS1 蛋白稀释成 8 个梯度,以每孔 100 μ L 包被反应板并于 4 $^{\circ}$ C 过夜;弃去包被液,用 PBST 洗涤 3 次,加含 5% 脱脂奶粉的 PBS 封

闭液于 4 $^{\circ}$ C 封闭过夜;用 PBST 洗涤 3 次。用稀释液将猪抗 JEV 阳性血清及阴性血清稀释成 6 个梯度后分别加到酶标板中,100 μ L/孔,37 $^{\circ}$ C 作用 1 h;用 PBST 洗涤 3 次,用羊抗猪的二抗 IgG 进行 1:10 000 倍稀释,100 μ L/孔,37 $^{\circ}$ C 作用 1 h;用 PBST 洗涤 5 次,加入 TMB 显色液,100 μ L/孔,37 $^{\circ}$ C 避光反应 20 min;加入终止液 2 mol/L H₂SO₄,50 μ L/孔,终止反应。用酶标仪测定 OD₄₅₀ 值,试验设标准阳性孔(P)、标准阴性孔(N),计算反应的 P/N 值,以 P/N 最大值作为间接 ELISA 最佳反应条件的判断依据。

2 结果

2.1 重组质粒 pc5X - NS1 的构建结果

提取重组质粒 pc5X - NS1,经限制性内切酶 BamH I 与 Xho I 双酶切后进行琼脂糖凝胶电泳分析,其酶切结果与预期结果一致,可切下与回收 NS1 基因片段大小相同的基因片段(见图 1);同时重组质粒中 BamH I、Xho I 间序列与 pc2X - NS1、质粒 pET30 - opti - JEV - NS1 中 NS1 编码序列完全一致。



1. NS1 基因回收产物; M1. DL - 2 000 Marker; M2. DL - 15 000 Marker; 2. 重组质粒 pc5X - NS1 经 BamH I 与 Xho I 双酶切结果。

图 1 NS1 基因的回收与重组质粒的酶切鉴定

Fig 1 Recovery of NS1 gene and identification of the recombinant plasmid by enzyme digestion

2.2 表达产物的 SDS - PAGE 电泳分析结果

用重组质粒转化 ER2523 感受态细胞后,于 28 $^{\circ}$ C、33 $^{\circ}$ C、37 $^{\circ}$ C 经 0.3 mmol/L IPTG 诱导 4 h,融合蛋白 MBP - NS1 都得到了表达并部分以可溶形式存在的,但是以 28 $^{\circ}$ C 诱导的可溶蛋白最多(见图 2)。

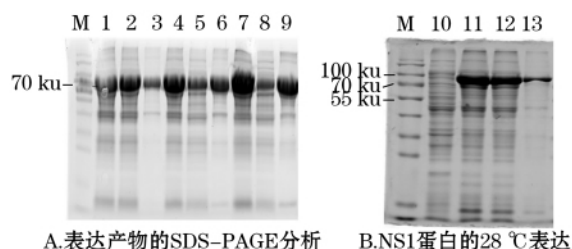
2.3 表达产物的纯化结果

利用直链淀粉树脂柱对融合蛋白 MBP - NS1 进行纯化,经 SDS - PAGE 分析发现得到了 2 种蛋白,一种为融合蛋白 MBP - NS1,另一种为标签蛋白 MBP。纯化结果表明: pMAL 融合蛋白表达与纯化试剂盒说明书介绍相符(见图 3)。

2.4 表达产物的 Western - blot 检测结果

Western - blot 检测结果表明,纯化的融合蛋白 MBP - NS1 能够与 JEV 猪阳性血清反应,见图 4。

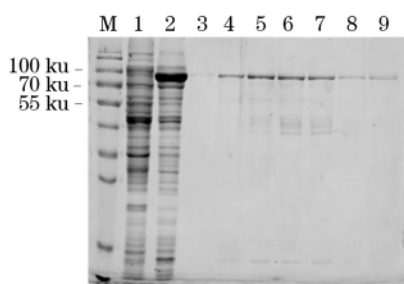
2.5 表达产物的间接 ELISA 方法建立



M. 低分子质量蛋白标准; 1, 11.28 °C 诱导后的全菌蛋白; 2, 12.28 °C 诱导后超声裂解上清液; 3, 13.28 °C 诱导物超声裂解后的沉淀; 4~6. 33 °C 诱导后的全菌蛋白、超声裂解上清液、超声裂解后的沉淀; 7~9. 37 °C 诱导后的全菌蛋白、超声裂解上清液、超声裂解后的沉淀; 10. 28 °C 未经诱导的 pc5X-NS1。

图 2 NS1 蛋白表达的 SDS-PAGE 分析

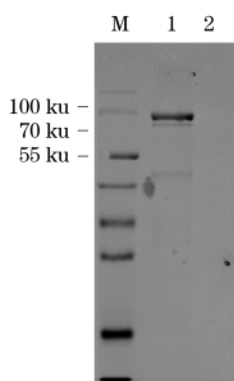
Fig 2 SDS-PAGE analysis of the expression of recombinant NS1 protein



M. 低分子质量蛋白标准; 1. 未经诱导的 pc5X-NS1; 2. 28 °C 诱导后超声裂解上清液; 3~9. 纯化的蛋白。

图 3 纯化蛋白的 SDS-PAGE 分析

Fig 3 SDS-PAGE analysis of purified protein



M. 低分子质量蛋白标准; 1. 纯化的表达产物; 2. 空载体对照。

图 4 表达产物的 Western-blot 分析

Fig 4 Analysis of the expressed product by Western-blot analysis

经确定最佳抗原稀释度为 1 : 320 (NS1 蛋白含量为 1.25 μg/mL); 当血清稀释度为 1 : 00 时, P/N 值最大, 确定血清的最佳稀释度为 1 : 100。同时用

建立的 ELISA 方法对收集的猪血清进行检测, 并分别对已经用商品化试剂盒检测的 20 份 JEV 阳性猪血清与 20 份 JEV 阴性猪血清进行检测, 结果表明, 该 ELISA 方法对 40 份猪血清样品检测结果与现有商品试剂盒检测结果一致, 阳性血清 OD₄₅₀ 值均大于 1.0, 阴性血清 OD₄₅₀ 值均小于 0.5 (见 157 页彩图 5)。

3 讨论

试验以乙型脑炎 NS1 基因为目的基因, PMAL-c5X 为载体构建了原核重组表达系统。蛋白表达的目的蛋白多以可溶形式存在并携带 MBP 标签, 易利用直链淀粉树脂柱对其进行纯化, 且纯化过程中不必进行变性和复性; 因此目的蛋白保持了完好的活性, 显示出了良好的抗原性和特异性, 为以后开展研究奠定了基础。

目前, 基因工程中获得蛋白的主要途径有原核表达、真核表达和细胞表达系统, 其中原核表达具有容易操作、成本低、可高效表达外源蛋白等优点而成为重组蛋白的首选。为了使 NS1 蛋白大量、稳定、高效表达并且获得大量可溶性蛋白, 试验对表达的条件进行了优化, 确定了合适的 OD₆₀₀ 值、IPTG 浓度和诱导温度, 保证了重组菌处于最佳工作条件。OD 值低, 则细菌数量太少, 外源蛋白产量低; OD 值高则细菌过老不利于蛋白的表达。IPTG 浓度和诱导温度是确保能获得大量可溶性蛋白的关键, IPTG 浓度和诱导温度过高则蛋白合成速度太快, 以至于没有足够时间进行折叠, 二硫键不能正确配对, 过多蛋白间发生非特异性结合, 蛋白质无法达到足够的溶解度形成包涵体; 因此需要找到合适的 IPTG 浓度和诱导温度。

由于 NS1 蛋白是非结构蛋白, 动物经灭活疫苗免疫不会产生相应的抗体, 这样可以区分自然感染动物和免疫动物。鉴于 NS1 蛋白自身的特点, 以其为抗原建立 ELISA 方法有着广阔的应用前景。试验应用 NS1 表达蛋白初步建立了 JEV 抗体的间接 ELISA 方法, 可以鉴别诊断自然感染和人工免疫的猪, 但在此基础上还需对敏感性和特异性进一步研究。

参考文献:

- [1] SOLOMON T. Control of Japanese encephalitis - within our grasp [J]. N Engl J Med, 2006, 355(9): 869-871.
- [2] 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.
- [3] SCHLESINGER J J, BRANDRIS M W, CROPP C B, et al. Protection against yellow fever in monkeys by immunization with Yellow fever virus nonstructural protein NS1 [J]. J Virol, 1986, 60(3): 1153-1155.
- [4] HAISTEAD S B. Pathogenesis of dengue: challenges of molecular biology [J]. Science, 1988, 239(4839): 476-481. (011)

乙型肝炎病毒 NS1 蛋白的可溶性表达与抗原性分析

(作者刘立科等,正文见第 17 ~ 19 页)

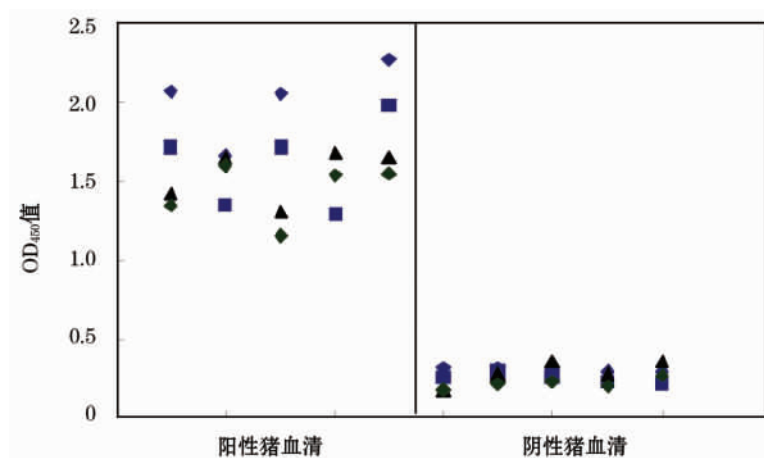


图 5 ELISA 方法检测猪血清结果

Fig 5 Detection of swine sera with ELISA

猪圆环病毒 2 型 (SX-07 株) 灭活疫苗免疫效果研究

(作者王贵华等,正文见第 124 ~ 125 页)

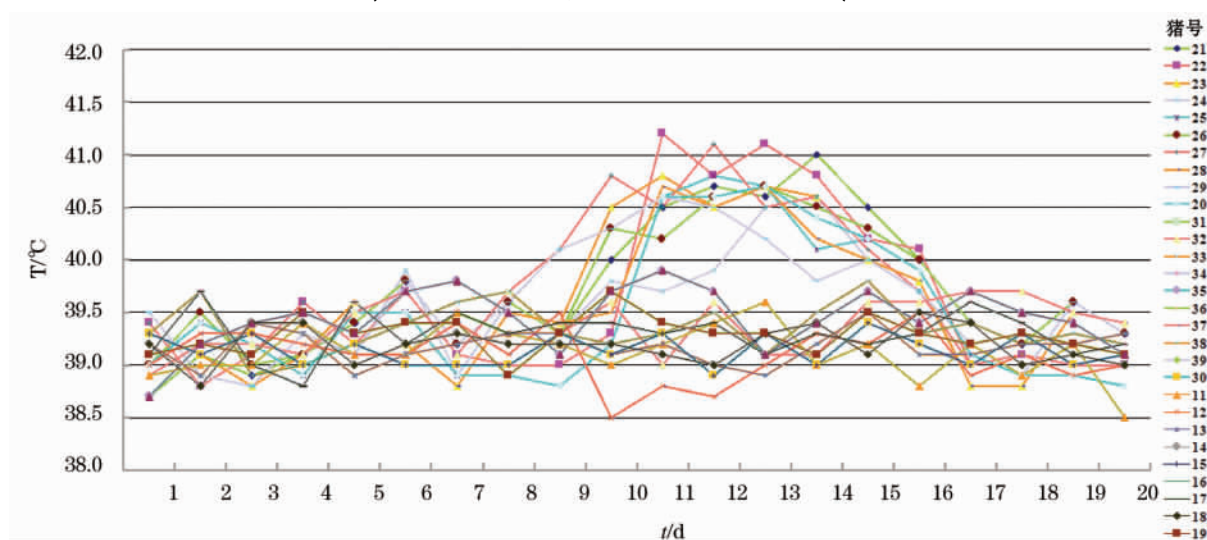
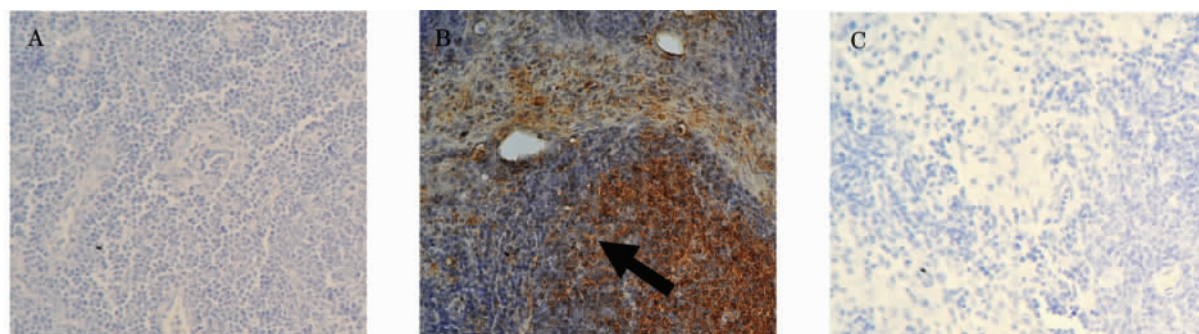


图 1 试验猪攻毒后体温记录曲线



A. 空白对照组; B. 安慰剂对照组; C. 免疫组。

图 2 试验猪肠系膜淋巴结免疫组化检测结果