

doi: 10.3969/j.issn.1008-0589.2013.01.17

鸭坦布苏病毒 NS1 基因的克隆及原核表达

郭建伟^{1,2}, 董嘉文², 孙敏华², 李林林², 袁建峰², 吴玄光¹, 胡奇林^{2*}

(1. 华南农业大学 兽医学院, 广东 广州 510642;

2. 广东省农业科学院兽医研究所 广东省兽医公共卫生公共实验室, 广东 广州 510640)

摘要: 为原核表达鸭坦布苏病毒(Duck tembusu virus, DTMUV) NS1 重组蛋白, 本研究通过 RT-PCR 方法扩增 NS1 基因, 将其亚克隆至 pET32a(+)载体中构建重组表达质粒 pET32a-NS1。将其转化大肠杆菌 Rosetta 中, 经 IPTG 诱导表达了约 59 ku 的重组蛋白。Western blot 分析表明, 该重组蛋白可以与 DTMUV 阳性血清发生特异性反应, 表明其具有良好的反应原性。

关键词: 鸭坦布苏病毒; NS1 基因; 克隆与表达

中图分类号: S852.65

文献标识码: A

文章编号: 1008-0589(2013)01-0071-03

Cloning and expression of NS1 gene of duck Tembusu virus

GUO Jian-wei^{1,2}, DONG Jia-wen², SUN Min-hua², LI Lin-lin², YUAN Jian-feng²,

WU Xuan-guang¹, HU Qi-lin^{2*}

(1. Institute of Veterinary Medicine, South China Agricultural University, Guangzhou 510642, China;

2. Guangdong Open Laboratory of Veterinary Public Health, Guangdong Academy of Agricultural Sciences, Guangzhou 510640, China)

Abstract: To express the NS1 of duck-origin Tembusu virus, the NS1 gene of DTMUV was amplified by RT-PCR and was cloned into pET32a(+) for expression in *E.coli*. The recombinant protein was highly expressed in a molecular weight of 59 ku. Western blot showed that the recombinant protein was reacted positively against the DTMUV antibodies. The results provide important basis for establishment of diagnostic and seroepidemiological monitoring method for DTMUV infection in ducks.

Key words: duck-origin Tembusu virus; NS1 gene; clone and expression

鸭坦布苏病毒(Duck tembusu virus, DTMUV)属于黄病毒科黄病毒属的坦布苏病毒,是 DTMUV 病的病原^[1-3]。DTMUV 病于 2010 年在华东地区首次发生,已蔓延至全国各地的养禽场。该病毒能够感染鸭、鹅和鸡^[4-5],蛋鸭发病后,临床上以病鸭厌食、排稀便、产蛋量急剧下降甚至停止,卵泡出血,变性,坏死为主要特征,其发病率高达 100%,死亡率为 5%~10%^[1-2],开展该病深入的流行病学研究具有重要的经济和公共卫生意义。目前,适用于该

病大规模血清流行病学研究的方法只有用纯化的全病毒抗原建立的间接 ELISA 方法^[6],但由于该方法采用全病毒抗原,具有潜在散毒的危险,同时成本高。因此,迫切需要建立一种更加安全、成本低廉的流行病学监测方法。

DTMUV 的基因组为不分节段的具有感染性的单股正链 RNA,长度为 10 990 个核苷酸,顺序为 5'-UTR-C-prM-E-NS1-NS2A-NS2B-NS3-NS4A-NS4B-N-NS5-UTR-3'。DTMUV 非结构蛋白 NS1 由 404 个氨基

*Corresponding author

收稿日期: 2012-05-22

基金项目: 公益性行业(农业)科研专项(201003012); 广东省科技厅项目(2008B020700001); 广东省农业厅项目([2010]540)

作者简介: 郭建伟(1986-),男,河南商水人,硕士研究生,主要从事禽类传染病研究。

* 通信作者: E-mail: hq1562713@163.com

酸组成^[7],具有保守性和抗原性。迄今为止,未见DTMUV NS1克隆表达的报道。本研究将DTMUV NS1基因克隆到pET32a(+)载体,在Rosetta中表达,获得重组表达的DTMUV NS1,为DTMUV病的诊断和血清流行病学监测方法的建立奠定基础。

1 材料和方法

1.1 病毒和菌株 DTMUV JM株及其抗血清,为广东省农业科学院兽医研究所禽病研究室分离鉴定、制备和保存;阳性血清是采自本实验室用DTMUV分离株感染DTMUV阴性鸭耐过后28 d的血清。

1.2 主要试剂及质粒 RNA抽提试剂盒、*Bam*H、*Hind*、T4 DNA连接酶、DNA Marker、pMD18-T Simple购自宝生物工程(大连)有限公司;M-MLV反转录酶购自Invitrogen公司;DNA胶回收试剂盒、质粒小提试剂盒购自天根生化科技(北京)有限公司;预染蛋白质Marker购自Fermentas公司;兔抗鸭IgG购自Nordic公司;OPD购自北京鼎国生物技术有限责任公司;大肠杆菌工程菌株DH5 α 、Rosetta、pET32a(+)为本实验室保存。

1.3 引物设计与合成 根据GenBank中DTMUV NS1基因序列(JF312912)设计引物,预计扩增片段大小为1 065 bp,引物由上海英潍捷基生物技术有限公司合成。上游引物:5'-TATGGATCCGACACGGGTGCTCAA-3' (*Bam*H);下游引物:5'-CCC AAGCTTAGCCATGACCTTT GATTT-3' (*Hind*)。

1.4 DTMUV NS1基因的扩增 参照RNA抽提试剂盒操作说明提取DTMUV RNA,反转录合成cDNA。以cDNA为模板进行RT-PCR扩增。反应条件为:94℃ 5 min;94℃ 30 s、53℃ 30 s、72℃ 1 min,30个循环;72℃ 10 min。PCR产物经1%琼脂糖凝胶电泳检测。

1.5 NS1扩增产物的克隆与测序 将扩增的NS1基因与pMD18-T-simple载体连接,转化至*E.coli* DH5 α 感受态细胞,提取重组质粒进行*Bam*H、*Hind*双酶切及PCR鉴定,由上海英潍捷基生物技术有限公司测序并将重组质粒命名为pMD18T-NS1。

1.6 重组表达载体的构建 将pMD18T-NS1经*Bam*H、*Hind*双酶切后的目的片段与经同样酶切的pET32a(+)载体连接,转化*E.coli* DH5 α 感受态

细胞,提取重组质粒进行双酶切及PCR鉴定,由上海英潍捷基生物技术有限公司测序,并命名为pET32a-NS1。

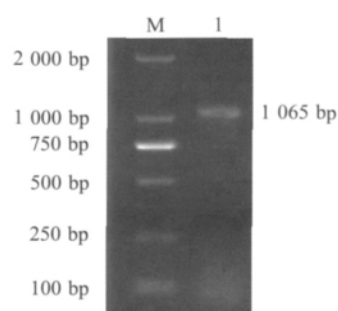
1.7 重组菌的诱导表达及蛋白可溶性分析 将pET32a-NS1转化Rosetta感受态细胞,37℃培养至OD_{600nm}达0.5~0.8,加IPTG至终浓度为1.0 mmol/L,37℃诱导3 h,进行SDS-PAGE分析。用超声仪破碎菌体,分离上清和沉淀,分别进行12% SDS-PAGE分析表达蛋白的可溶性。

1.8 重组蛋白的提取及纯化 将诱导表达的重组菌用超声波裂解,离心,弃去上清,加15 mL Binding Buffer重悬菌体,冰浴2 h,4℃ 11 000 r/min离心20 min,收集上清,得溶解的包涵体。按Novagen公司的Ni-NTA His.Bind树脂说明书对重组蛋白进行纯化,进行浓缩,bradford方法测定蛋白浓度。

1.9 Western blot检测 表达的NS1重组蛋白经SDS-PAGE电泳后,电转印至NC膜。以1:50倍稀释的DTMUV阳性血清为一抗,1:5 000 HRP标记的羊抗鸭IgG为二抗,用DAB显色。

2 结果与讨论

2.1 DTMUV NS1基因RT-PCR PCR产物经1%琼脂糖凝胶电泳检测显示,获得了一条约1 100 bp的特异性片段,与预期大小(1 065 bp)一致(图1)。



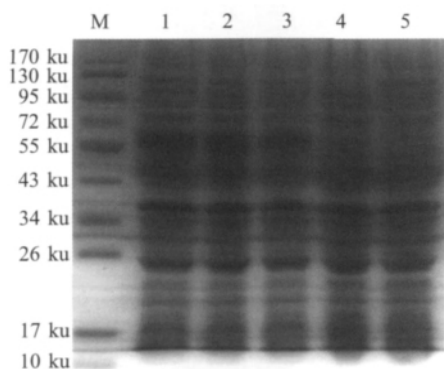
M: DNA Marker DL2000; 1: NS1基因RT-PCR产物
M: DNA Marker DL2000; 1: PCR product of NS1 gene

图1 DTMUV NS1基因RT-PCR扩增结果
Fig.1 Amplification of DTMUV NS1 gene by RT-PCR

2.2 pET32a-NS1的鉴定 pET32a-NS1经酶切鉴定,与预期结果一致。并将测序结果与标准株进行比较,结果显示扩增的目的片段与参考基因的核苷酸序列同源性为99%。

2.3 阳性重组菌的诱导表达及蛋白可溶性分析 pET32a-NS1经IPTG诱导表达,将表达重组蛋白进

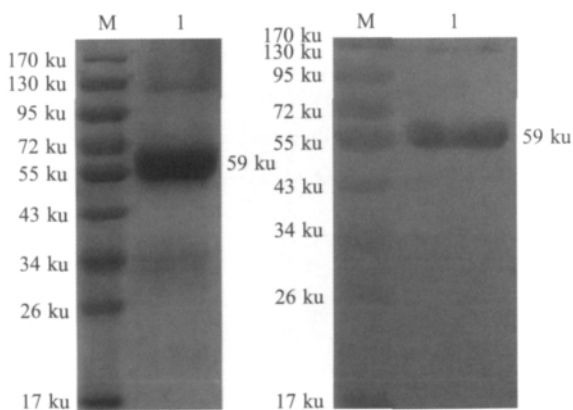
行 SDS-PAGE 分析, 结果表明, 在约 59 ku 出现一条特异性蛋白条带, 与预期的蛋白分子量大小一致(图 2)。诱导表达的重组菌经超声裂解后, 分别收集上清和沉淀进行 SDS-PAGE, 结果表明表达的重组蛋白主要以包涵体形式存在。



M: Prestained protein Marker; 1-3: pET32a-NS1/Rosetta express products; 4: pET32a-NS1/Rosetta express products without induction; 5: pET32a(+)/Rosetta express products

图 2 重组 NS1 蛋白 SDS-PAGE 结果
Fig.2 SDS-PAGE results of recombinant NS1 protein

2.4 NS1 重组蛋白 western blot 检测 用 DTMUV 阳性血清对该重组蛋白进行 western blot 检测, 结果显示, 在约 59 ku 处有一条特异条带, 表明 NS1 重组蛋白能够与 DTMUV 阳性血清特异性结合, 证明该蛋白具有良好的反应原性(图 3)。



M: Prestained protein Marker; 1: NS1 recombinant protein

图 3 Western blot 分析结果
Fig.3 Western blot analysis of NS1 recombinant protein

NS1 是 DTMUV 的非结构蛋白, 其功能尚不清楚。而黄病毒科登革病毒(DENV)的 NS1 是 DENV 非结构蛋白中唯一的糖蛋白, 是唯一能够在感染细

胞表面表达和分泌到胞外的非结构蛋白, 高度保守, 含有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, 检测血清中 NS1 水平可以用于 DENV 感染的早期诊断和分型诊断^[8]。针对非结构蛋白的抗体只在病毒感染的宿主中存在, 而在经灭活疫苗免疫的动物体内检测不到, 从而可以区别感染动物和免疫动物^[9]。因此, 开展 DTMUV NS1 的表达研究, 将为建立能够区别 DTMUV 感染的动物和灭活疫苗免疫动物的检测方法奠定基础, 对该病的防控及净化具有重要意义。

本研究为研制能够区分感染动物和免疫动物的安全、成本低廉的血清学检测方法和试剂奠定了基础, 对该病的有效防制具有重要意义。

参考文献:

- [1] Su Jing-liang, Li Shuang, Hu Xu-dong, et al. Duck egg-drop syndrome caused by BYD virus, a new Tembusu-related flavivirus [J]. PLoS One, 2011, 6(3): e18106.
- [2] 曹贞贞, 张存, 黄瑜, 等. 鸭出血性卵巢炎的初步研究[J]. 中国兽医杂志, 2010, 46(12): 3-6.
- [3] 滕巧决, 颜丕熙, 张旭, 等. 一种新的黄病毒导致蛋鸭产蛋下降及死亡[J]. 中国动物传染病学报, 2010, 18(6): 1-4.
- [4] 陈仕龙, 陈少莺, 王劭, 等. 一种引起蛋鸡产蛋下降的新型黄病毒的分离与初步鉴定[J]. 福建农业学报, 2011, 26(2): 170-174.
- [5] 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.
- [6] 姬希文, 闫丽萍, 颜丕熙, 等. 鸭坦布苏病毒抗体间接 ELISA 检测方法的建立[J]. 中国预防兽医学报, 2011, 33(8): 630-634.
- [7] Tang Y, Diao Y, Gao X, et al. Analysis of the complete genome of Tembusu virus, a flavivirus isolated from ducks in China [J]. Transbound Emerg Dis, 2012, 59(4): 336-343.
- [8] 但妍, 张娟, 张君, 等. 2 型登革病毒 ns1 基因克隆及其表达产物的生物学特性研究[J]. 生物技术通报, 2008(2): 168-171.
- [9] Shu Pei-yun, Chen Li-kuang, Chang Shu-fen, et al. Dengue NS1-specific antibody responses: isotype distribution and serotyping in patients with Dengue fever and Dengue hemorrhagic fever [J]. J Med Virol, 2000, 62(2): 224-232.

(本文编辑: 李 爽)