

H9N2亚型禽流感病毒 ns1基因的融合表达

陈 丽, 谢青梅, 李少璃, 王敬师, 马静云, 毕英佐, 曹永长

(华南农业大学动物科学学院, 广东广州 510642)

摘要: 禽流感病毒(AIV)非结构蛋白Ns1在病毒粒子中不存在, 因此, 可以通过检测Ns1抗体来鉴别禽流感病毒感染鸡群和免疫鸡群. 将ns1基因和T4噬菌体soc基因在大肠埃希氏菌中融合表达, 融合蛋白可以作为鉴别禽流感免疫鸡群和感染鸡群的检测抗原. 采用RT-PCR方法扩增禽流感病毒H9N2的ns1基因(654 bp); 将该片段克隆至pSOC质粒soc基因3'端, 成功构建了重组质粒pSOC-NS1, 用该重组质粒转化E.coli B121(DE3)感受态细胞, 以终浓度1 mmol/L的IPTG诱导表达. SDS-PAGE结果表明pSOC-NS1融合蛋白相对分子质量约39 000. Western-blot证实, 表达产物与AI H9N2病毒感染的小鼠血清具有良好的反应性.

关键词: 禽流感病毒; ns1基因; soc基因

中图分类号: S855. 6 文献标识码: A 文章编号: 1001-411X(2006)02-0092-04

Fusion Expression of ns1 Gene of Avian Influenza Virus H9N2

Subtype in E. coli BL 21 (DE3)

CHEN Li, XIE Qing-mei, LI Shao-li, WANG Jing-shi, MA Jing-yun, BI Ying-zuo, CAO Yong-chang

(College of Animal Science, South China Agric. Univ., Guangzhou 510642, China)

Abstract: Non-structural protein (NS1) of avian influenza virus (AIV) does not exist in virion, so it could be used to detect NS1 antibody for the differentiation of infected flocks from vaccinated ones. In the present study, ns1 gene was expressed fusing with soc gene of T4 bacteriophage in E. coli, and fusion protein could be used as antigen to detect antibody against NS1 protein. The ns1 gene with a length of 654 bp was amplified by RT-PCR from AIV subtype H9N2. The ns1 fragment was inserted into plasmid pSOC to obtain recombinant plasmid pSOC-NS1 in which ns1 gene was fused into the 3'-terminal of soc gene. pSOC-NS1 was transformed into E. coli BL 21 (DE3) to induce ns1 gene expression with 1 mmol/L IPTG. A NS1 fusion band with relative molecular mass of approximately 39 000 was observed on the SDS-PAGE gel and nitrocellulose membrane. Western-blot analysis confirmed that the fusion protein could specifically react with the mouse sera infected with live avian influenza virus H9N2 subtype.

Key words: avian influenza virus; ns1 gene; soc gene

禽流感(avian influenza, AI)又称真性鸡瘟,是由正粘病毒科A型流感病毒引起的禽类(家禽和野禽)的一种感染和/或疾病综合征. 主要发生在鸡、鸭、鹅、鸽子等禽类和鸟类身上,但主要侵害火鸡和鸡,哺乳动物如猪、马、海豹、人等也可感染^[1]. 世界动物卫生组织(OIE)规定该病为A类烈性传染病^[2-3].

目前,我国对高致病性禽流感采用免疫兼扑杀的政策,对低致病性禽流感主要采取疫苗免疫的方法. 疫苗的大量使用干扰了禽流感疫情的监测,因为传统的监测禽流感的血清学方法主要是琼脂扩散试验(AGP)和血凝抑制试验(HI). 这2种方法都不能区分禽流感疫苗免疫产生的抗体和禽流感病毒感染后

收稿日期:2005-05-10

作者简介:陈 丽(1982-),女,硕士研究生;通讯作者:曹永长(1965-),男,博士,教授,E-mail: yccao@scau.edu.cn

基金项目:广东省科技计划项目(2004A2090102)

产生的抗体. 这不仅干扰禽流感的诊断, 增加禽流感的防控难度, 而且还严重影响出口.

禽流感病毒(AIV)为单股负链 RNA 病毒, A 型流感病毒基因由 8 个不连续的病毒 RNA 节段组成. 片段 8 即 *ns* 基因在 8 个片段中最短, 编码非结构蛋白. 这种蛋白仅仅出现在病毒感染期, 而在使用灭活疫苗免疫时不会产生. 非结构蛋白(NS1)可以抵抗干扰素对蛋白质合成的抑制作用^[4]. 而且能够抑制宿主细胞 Pre2mRNA 的运输和剪接, 在病毒复制过程及与细胞蛋白质的相互作用中发挥重要作用, 从而关闭宿主细胞的基因表达, 并且可以增强病毒 mRNA 翻译的效率^[4]. 反向遗传系统试验已证实, 在病毒感染期间, NS1 蛋白的 N 端区域有增强病毒蛋白合成的功能^[5]. 更为重要的是 NS1 蛋白能使流感病毒逃逸宿主的免疫防御, 在抑制干扰素(IFN α/β)及肿瘤坏死因子(TNF β)介导的抗病毒反应中起重要作用^[6]. 本研究旨在通过 RT-PCR 技术克隆 *ns1* 基因, 并将其与 T4 噬菌体 *soc* 基因在大肠埃希氏菌中融合表达, 为建立鉴别诊断禽流感免疫群和感染群的诊断方法奠定基础. 这对于禽流感的诊断和防控研究具有重要的现实意义和实用价值.

1 材料与方法

1.1 毒株、菌种和质粒

A/Chicken/ Guangdong/2001(H9N2)毒株、*E. coli* BL21(DE3)、*E. coli* DH5 α 均为华南农业大学家禽研究室保存. 质粒 pSOC 为含有 T4 噬菌体小外壳蛋白基因 *soc* 的原核表达质粒^[7], 由任兆钧博士提供, 华南农业大学家禽研究室保存.

1.2 主要试剂

AMV 反转录酶、Ex *Taq* DNA 聚合酶、RNA 酶抑制剂、TrizolLSReagent RNA 提取试剂盒、E. Z. N. A Plasmid Minipreps Kit 等购自大连宝生物工程公司; 山羊抗小鼠 IgY 购自 Bio-Rad 公司.

1.3 引物

参照 GenBank 中 AIV *ns1* 基因序列设计 2 对引物. 引物对 NS1F1/NS1F2 用于 RT-PCR 扩增基因 *ns1*, 与 T 载体连接; NS1P1/NS1P2 扩增 *ns1* 基因用于与 T4 噬菌体 *soc* 基因融合; 另据 SOC 序列设计 1 条上游引物(SOC up), 用于检测 *ns1* 基因功能区在 pSOC 质粒的连接方向. 引物序列如下:

NS1F1:5'-ATGGATTCCAACACTG-3';

NS1F2:5'-CTACTTTGGAGGGAG-3';

NS1P1:5'-ATGAATTCTATGGATTCCAACACTG-3';

NS1P2:5'-ATGAATTCGCTACTTTGGAGGGAG-3';

SOC up:5'-ATATGGCTAGTACTCGCGGT-3'.

1.4 *ns1* 基因的 RT-PCR 扩增

参照 RizolLSReagent 说明书提取病毒 RNA, 以 NS1F1/NS1F2 为引物, 在 AMV 反转录酶作用下合成 *ns1* 基因的 cDNA, RT 产物直接用于 PCR 扩增 *ns1* 基因的模板. 按常规方法扩增 *ns1* 基因, 反应条件为: 94 °C 预变性 3 min; 94 °C 变性 40 s, 50 °C 退火 90 s, 72 °C 延伸 90 s, 循环 30 次, 最后 72 °C 延伸 10 min. PCR 产物用 10 g/L 琼脂糖凝胶电泳检测.

1.5 *ns1* 基因的克隆与鉴定

用 10 g/L 琼脂糖凝胶电泳纯化 PCR 产物, 用 Ex *Taq* 加 A 尾, 加尾产物在 T4 DNA 连接酶作用下连接到 pGEM®-T Easy 载体, 连接产物直接用于转化 *E. coli* DH5 α 感受态细胞. 用 PCR 筛选阳性重组质粒, 重组质粒命名 T-NS1.

将通过 PCR 筛选的阳性重组质粒送博亚公司进行测序. 在互联网上用 NCBI BLAST 软件对 *ns1* 基因序列与 GenBank 中注册的相应基因序列进行比较.

1.6 pSOC-NS1 表达质粒的构建

以阳性的 T-NS1 质粒为模板按 1.4 的条件, 用 NS1P1/NS1P2 引物 PCR 扩增 *ns1* 基因功能片段.

将 *Eco*RI 消化的 *ns1* 基因与 pSOC 质粒连接, 用连接产物直接转化 DH5 α 感受态细胞, 转化子分别用 NS1P1/NS1P2 和 SOC up/NS1P2 2 对引物进行 PCR 筛选. 2 对引物鉴定均为阳性的为含有 *ns1* 基因且插入方向正确的转化子, 其质粒命名为 pSOC-NS1.

1.7 pSOC-NS1 在大肠埃希氏菌中的表达

用上述阳性重组质粒 pSOC-NS1 转化 *E. coli* BL-21(DE3), 加入 IPTG 至终浓度 1 mmol/L 诱导表达, 分别于诱导后 1、2、3、4、5 h 取样检测表达产物. 12 000 r/min 离心 1 min, 去上清液, 细菌沉淀中加入 100 μ L SDS-PAGE 1 $\times$ 上样缓冲液, -80 与 37 °C 反复冻融 3 次. 取不含外源片段的 BL-pSOC 菌液进行表达, 诱导 4 h 后同样处理, 作为对照.

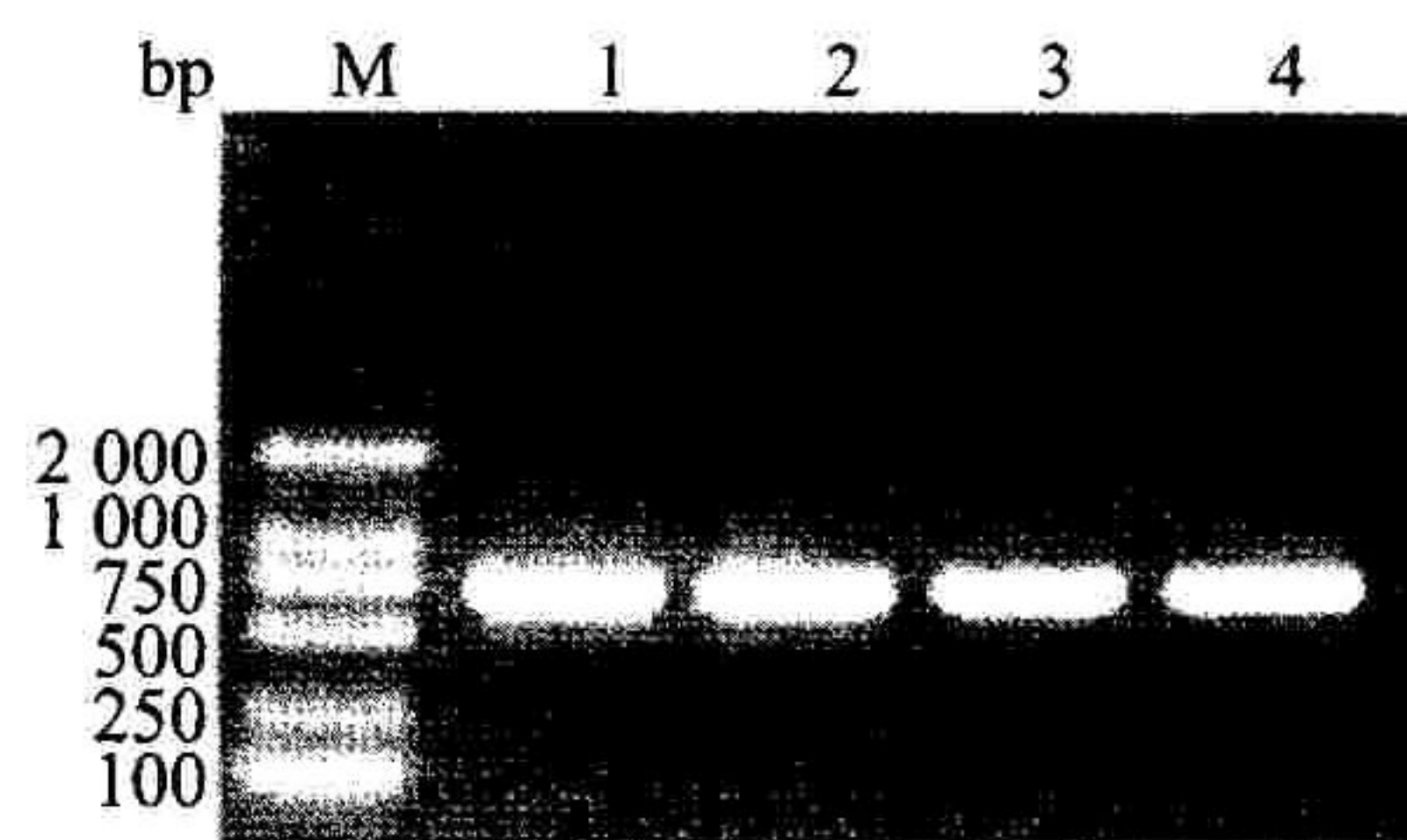
用 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)检测目的蛋白. 浓缩胶的质量分数为 5%, 分离胶的质量分数为 12%. 接着, 用感染 H9N2 禽流感病毒的小鼠阳性血清对表达产物进行 Western-blot 检测.

2 结果

2.1 *ns1* 基因的 RT-PCR 扩增与克隆

采用 NS1F1/NS1F2 引物对进行 RT-PCR, 从 H9N2 毒株中扩增出 *ns1* 基因, *ns1* 大小约为 654 bp,

与预期结果相符(图1)。



M: DNA marker DL2000; 1~4 为 H9N2 禽流感病毒的 *ns1* 基因

M: DNA marker DL2000; 1-4: *ns1* gene of AIV strain A/Chicken/Guangdong/1/2001 (H9N2)

图1 H9N2 *ns1* 基因的 RT-PCR 扩增

Fig. 1 RT-PCR amplification of *ns1* gene of H9N2 subtype AIV

ns1 基因的 RT-PCR 产物经纯化、加尾后,插入到 pGEM-T Easy 载体的外源基因插入位点,重组质粒转化 *E. coli* DH5 α ,挑菌落进行培养,以培养的菌液为模板进行 PCR 鉴定,扩增到预期的目的条带。

阳性克隆的测序结果表明, H9N2 禽流感病毒 *ns1* 基因长度为 654 bp,编码 217 个氨基酸,与 GenBank 中注册的相应基因序列进行比较,其核苷酸同源率为 96%~98%,氨基酸的同源率为 87%~97%。*ns1* 基因序列及推导的氨基酸序列如图 2 所示。

```

1-60  ATGGATTCCAACACTGTGTCAAGTTTCCAGGTAGACTGCTTTCTTGGCATGTCCGAAA
1-20  M D S N T V S S F Q V D C F L W H V R K
61-120 CGATTTCAGACCAAGAAGTGGGTGATGCCCATTTCTAGACCGGCTTCGCCGAGATCAG
21-40  R F A D Q E L G D A P F L D R L R R D Q
121-180 AAGTCCCTAAAAGGAAGAGGCAGCACTCTTGGTCTGGACATCAGAACCGCCACTCGTGAA
41-60  K S L K G R G S T L G L D I R T A T R E
181-240 GGAAAGCATATAGTGGAGCGGATTCTGGAGGAAGAGTCAGATGAGGCCTTAAATGACT
61-80  G K H I V E R I L E E E S D E A L K M T
241-300 ACTGCTTCAGTGCAGCTCCACGCTACCTAAGTACATGACTCTTGAAGAAATGTCAAAA
81-100  T A S V P A P R Y L T D M T L E E M S K
301-360 GATTGGTTAATGCTCATTCCCAACAGAAAGTGACAGGGTCCCTTGCATTAGAATGGAC
101-120 D W L M L I P K Q K V T G S L C I R M D
361-420 CAAGCTATAGTGATAAAACATCATTGAAAGCAAATTCAGTGTGATTTTAATCGA
121-140 Q A I V D K N I T L K A N F S V I F N R
421-480 CTGGAAGCTCTAATACTACTAGAGCTTTTACAGACGAAGGAACAATAGTGGGTGAAATC
141-160 L E A L I L R A F T D E G T I V G E I
481-540 TCACCATTAACCTTCTCTCCAGGACATACTGATGAGGATGTCAAAAATGCAATGGGGTC
161-180 S P L P S L P G H T D E D V K N A I G V
541-600 CTCATCGGAGGATTGGAATGGAATGATAACACAGTTTCGAGTCTCTGAACTCTACAGAGA
181-200 L I G G F E W N D N T V R V S E T L Q R
601-654 TTCGCTGGAGAAACAGCGATGAGAATGGGAGACCTCCACTCCCTCCAAAGTAG
201-217 F A W R N S D E N G R P P L P P K *

```

图2 禽流感毒株 A/Chicken/Guangdong/2001 (H9N2) *ns1* 基因序列及推导的氨基酸序列

Fig. 2 Nucleotide sequence and deduced amino acid sequence of *ns1* gene of avian influenza virus strain A/Chicken/Guangdong/2001 (H9N2)

2.2 重组转化子的构建与阳性表达菌株的获得

用特异性引物 NS1P1/NS1P2 从重组质粒 T-NS1 上扩增 *ns1* 基因,获得大小为 654 bp 的 DNA 片段。经 *Eco*RI 消化的 *ns1* 基因片段与线性化载体 pSOC 在 T4-DNA 连接酶的作用下进行体外连接,连接产物直接用于转化 *E. coli* DH5 α 感受态细胞。用 NS1P1/NS1P2 和 SOC up/NS1P2 特异性引物进行 PCR 筛选。用 2 对引物 PCR 筛选为阳性的重组质粒转化 *E. coli* BL21 (DE3),在 LA 平板上挑取单个菌落培养,以菌液为模板,用 2 对引物进行 PCR 检测,将鉴定为

阳性的含有 pSOC-NS1 重组质粒的表达菌命名为 BL-SOC-NS1(图3)。



M: DNA marker DL2000; pSOC-NS1 重组子用不同引物检测的结果,1~4: NS1P1/NS1P2 引物检测,5~8: SOC up/NS1P2 特异性引物检测

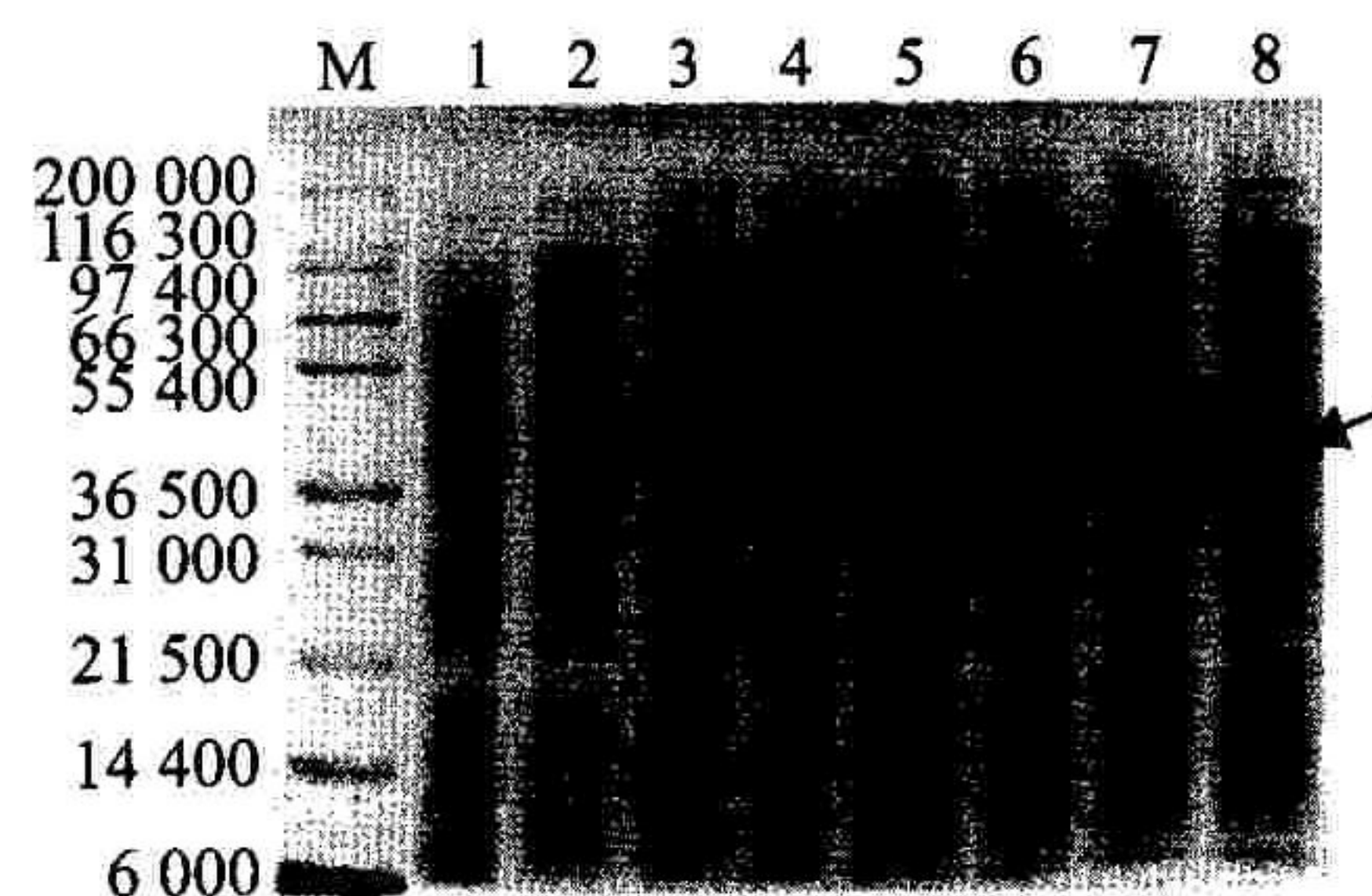
M: DNA marker DL2000; the results of PCR screening for recombinant plasmid pSOC-NS1 with two different primer sets, 1-4: PCR products of 4 recombinants amplified using primers NS1P1/NS1P2; 5-8: PCR products of 4 recombinants amplified using primers SOC up/NS1P2

图3 pSOC-NS1 重组子的 PCR 筛选

Fig. 3 Screening of recombinant plasmid pSOC-NS1 by PCR amplification

2.3 pSOC-NS1 融合基因的诱导表达

取 BL-SOC-NS1 接种到 LA 液体培养基中,待细菌浓度达到 $D_{600\text{ nm}}$ 为 0.4~0.5 时加入 IPTG 用 SDS-PAGE 检测表达产物,同时以 pSOC 空质粒转化 *E. coli* BL 21 (DE3) 的诱导表达产物为对照,检测结果(图4)表明,在加入诱导剂 1 h 后即能检测到融合蛋白,表达的融合蛋白相对分子质量约为 39 000。

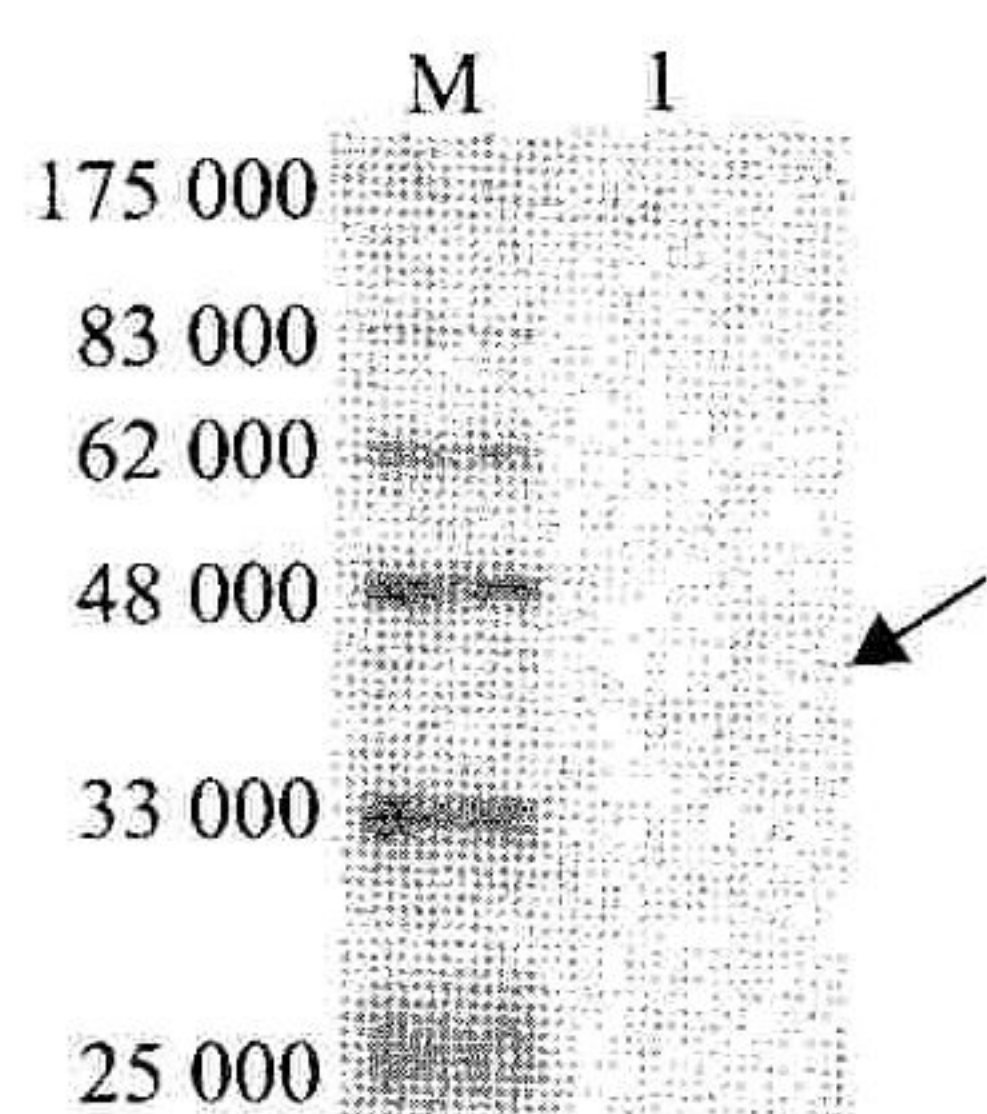


M: 蛋白质相对分子质量标准;1:空质粒对照,加入 IPTG 诱导 4 h 的细菌裂解物;2:没有加 IPTG 诱导的对照,3~8:分别为 IPTG 诱导 0、1、2、3、4、5 h 的细菌裂解物,箭头所指为 pSOC-NS1 目的条带

M: protein relative molecular mass marker; 1: the lysate of soc plasmid induced with IPTG 4 h; 2: the sample without IPTG; 3~8: the lysate induced with 1 mmol/L IPTG for 0, 1, 2, 3, 4, 5 h, respectively. pSOC-NS1 was indicated by an arrow

图4 大肠杆菌表达的 pSOC-NS1 融合蛋白的 SDS-PAGE 分析
Fig. 4 SDS-PAGE analysis of pSOC-NS1 fusion expression products induced by IPTG

经质量分数为 12% 的 SDS-PAGE 电泳,然后转移硝酸纤维素膜,用特异性的小鼠抗禽流感阳性血清对 NS1 蛋白进行免疫印迹分析(Western-blot),结果如图 5 所示,在硝酸纤维素膜上大约 39 000 处出现一特异性条带。



M: 预染蛋白质相对分子质量标准; 1: pSOC-NS1 融合蛋白
M: prestained protein relative molecular mass standard; 1: pSOC-NS1 fusion protein

图5 pSOC-NS1 融合蛋白 Western-blot 分析

Fig. 5 Western-blot analysis of pSOC-NS1 fusion protein

3 讨论

ns 基因编码非结构蛋白,其基因长度 890 个核苷酸,有 2 个读码框,可编码 2 种蛋白质 NS1 和 NS2,两者的相对分子质量分别为 25 000 和 14 000. 这 2 种蛋白质大量存在于感染细胞中,NS1 主要在核内,NS2 主要在细胞浆内,在病毒粒子中也会有少量存在,而 NS1 蛋白在病毒粒子中不存在. 在感染的早期,可发现细胞核内有大量 NS1 蛋白存在,在感染晚期,NS1 蛋白可以在细胞浆中出现,而 NS2 在后期才会合成产生^[8]. 作为病毒的非结构成分,NS1 蛋白出现仅仅只局限在病毒感染期,它可刺激机体产生非结构蛋白抗体. 因此,针对 NS1 蛋白的抗体只可能现于病毒感染群中. 研究表明,非结构蛋白及其抗体可作为禽流感病毒感染机体的一个重要标记^[9-10].

本研究成功地将 H9N2 禽流感病毒的 ns1 基因在大肠杆菌中进行了融合表达. Western-blot 分析表明,融合蛋白能与感染了禽流感病毒的小鼠血清产生特异性反应. 这为进一步采用融合蛋白 SOC-NS1 为抗原建立检测 NS1 抗体的免疫学方法奠定了基础.

参考文献:

- [1] 甘孟侯. 禽流感[M]. 北京:中国农业出版社, 2002:1-4.
- [2] PEREIRA H G, TUMOV B, LAW V G. Animal influenza A virus [J]. World Health Organization, 1965, 32: 855-860.
- [3] ALEXANDER D J. A review of influenza in different bird species [J]. Vet Microbiol, 2000, 74:3-13.
- [4] EGOROV A, BRANDT S, SEREINIG S, et al. Transfectant influenza A viruses with long deletions in the NS1 protein grow efficiently in vero cells [J]. Virol, 1998, 72(8): 6 437-6 441.
- [5] 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 shut off of host protein synthesis [J]. Virol, 2002, 76(3): 1 206-1 212.
- [6] SEO S H, HOFFMANN E, WEBSTER R G, et al. Lethal H5N1 influenza viruses escape host antiviral cytokine responses [J]. Nat Med, 2002, 8 (9): 950-954.
- [7] REN Zhao-jun, LEWIS G K, WINGFIELD P T, et al. Phage display of intact domains at high copy number. A system based on SOC, the small outer capsid protein of bacteriophage T4 [J]. Protein Science, 1996 (5): 1 833-1 843.
- [8] SKEHEL J J. Polypeptide synthesis in influenza virus-infected cells [J]. Virol, 1972, 49:23-36.
- [9] INONE 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, 73:2 151-2 154.
- [10] NIETZERT E, BECK E, de MELLO P A, et al. Expression of the aphthovirus RNA polymerase gene in *Escherichia coli* and this use with other bioengineered infection [J]. Virol, 1991, 1847:799-804.

【责任编辑 柴 焰】