

马平,杨婧,刘宇卓,等. H9N2 亚型禽流感病毒 NS1 蛋白原核表达载体的构建及表达[J]. 江苏农业科学,2022,50(1):40-44.  
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2022.01.007

# H9N2 亚型禽流感病毒 NS1 蛋白 原核表达载体的构建及表达

马平<sup>1,2</sup>, 杨婧<sup>1</sup>, 刘宇卓<sup>1</sup>, 李银<sup>1</sup>, 黄欣梅<sup>1</sup>, 赵冬敏<sup>1</sup>, 韩凯凯<sup>1</sup>, 章丽娇<sup>1</sup>, 刘青涛<sup>1</sup>

(1. 江苏省农业科学院兽医研究所, 江苏南京 210014; 2. 南京农业大学动物医学院, 江苏南京 210095)

**摘要:**为对 H9N2 亚型禽流感病毒(AIVs) NS1 基因进行原核表达,并对表达产物进行抗原性分析,根据 NS1 基因合成 1 对特异性引物,进行 PCR 扩增,将扩增片段连接至 PMD18-T 载体,通过序列测定和比对筛选出保真基因克隆;将保真基因克隆至 pET32a 表达载体,构建重组质粒 pET32a-NS1 后转化至大肠杆菌 BL21(DE3)中,加入 IPTG 进行诱导表达;并对 IPTG 使用浓度和诱导时间进行优化,对表达的重组蛋白用 His-tag 镍柱进行纯化,利用 Western Blot 和免疫荧光技术对纯化的重组蛋白进行鉴定及免疫原性的测定。结果显示,本试验成功扩增出 H9N2 AIVs 的 NS1 基因,并筛选到保真克隆;带有 NS1 保真基因的重组载体 pET32a-NS1 可在大肠杆菌中进行 IPTG 诱导表达,其中, IPTG 最佳使用浓度为 2 mmol/L、最佳诱导时间为 8 h 时表达量最大,并且表达产物主要存在于包涵体中;纯化后的重组蛋白可被抗 His 标签识别,利用重组蛋白制备的抗体可识别 H9N2 AIVs 在细胞内表达的 NS1 蛋白,说明重组蛋白具有良好的免疫原性,该试验为 H9N2 AIVs NS1 蛋白的功能特性和免疫学研究奠定了基础。

**关键词:**禽流感病毒; NS1 蛋白; 原核表达; 蛋白纯化; 蛋白免疫印迹

**中图分类号:** S852.65<sup>+</sup>7 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2022)01-0040-05

禽流感病毒属于正黏病毒科中的甲型流感病毒属,它由 8 个分节段的有包膜的单股负链 RNA 构成了全基因组,且每个节段至少编码一种蛋白质, AIVs 共编码 11 种蛋白<sup>[1-4]</sup>。其中,非结构蛋白 NS(nonstructural)基因是内部基因组中最小的基因节段,它共编码 NS1 和 NS2(NEP)2 种蛋白<sup>[5]</sup>,非结构蛋白 NS1 存在于除病毒颗粒以外的病毒上清或是被感染的细胞体内。NS1 蛋白在 AIVs 感染早期主要存在于细胞核中,随着感染时间的推移, NS1 蛋白分布扩散至细胞浆中,并且能刺激机体产生特异性抗 NS1 蛋白的抗体<sup>[6]</sup>。NS1 的 C-末端效应结构域是与宿主相互作用最频繁的功能结合区,其中,第 134~161 位氨基酸为其核心序列,该部分序列发挥了阻断宿主 mRNA 剪接、多聚腺苷酸化和核输出等一系列作用<sup>[7-8]</sup>。NS1 在病毒-宿主相互关系中发挥了极其重要的作用,该病毒成分不仅在 AIVs 感染

宿主过程中能拮抗机体的天然免疫反应,而且可以影响流感病毒的致病性和宿主的适应性<sup>[9]</sup>,因此对 NS1 蛋白的功能、致病性等进行进一步研究至关重要。

NS1 是由流感病毒最后一个节段的 RNA 编码合成,该蛋白含 202~237 个氨基酸且其大小约为 26 ku<sup>[8]</sup>,它的结构域包括:N 末端 1~73 个氨基酸构成的 RNA 结合结构域和 C 末端 88~202 个残基的效应结构域,两者之间连接区域为 10~15 个氨基酸形成的链接区域<sup>[10-11]</sup>。NS1 蛋白是一种从病毒和宿主两方面进行调节的多功能调控蛋白,从病毒方面来讲, NS1 蛋白通过提高流感病毒的翻译能力,提高病毒对宿主的抗病毒反应从而直接性地增强流感病毒的致病作用;从宿主方面来讲, NS1 蛋白可通过拮抗干扰素、调控宿主细胞凋亡、抑制宿主细胞蛋白的合成等方式来减弱宿主机体的抗病毒反应从而间接性地增强病毒的致病作用<sup>[8,12-15]</sup>。因此,对 NS1 蛋白功能的拮抗能够降低甲型流感病毒的复制效率和限制病毒传播空间,具有良好的应用价值<sup>[16]</sup>。

本研究于 2019—2021 年在江苏省农业科学院兽医研究所对 NS1 的基因特性进行了分析,成功构建重组质粒 pET32a-NS1,并在 BL21(DE3)感受态

收稿日期:2021-06-03

基金项目:国家自然科学基金面上项目(编号:31972691)。

作者简介:马平(1997—),女,江苏南通人,硕士研究生,主要从事家禽疫病研究工作。E-mail:1204383706@qq.com。

通信作者:刘青涛(1981—),男,山东滨州人,博士,副研究员,主要从事家禽疫病致病机制与免疫防控技术研究。E-mail:taoqingliu2013@163.com。

细胞中进行优化表达,对表达的重组蛋白进行分析和纯化后通过 Western-blot 和免疫荧光来鉴定,为后续疫苗研发及诊断方法的探究奠定试验基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 病毒、载体和菌株

H9N2 亚型禽流感病毒和 pET32a 原核表达载体由江苏省农业科学院兽医研究所禽病实验室保存;DH5 $\alpha$  和 BL21 感受态细胞购自南京擎科生物科技有限公司;pMD18-T 载体购自 TaKaRa 公司。

### 1.2 主要试剂

QuickCut *Xho* I 和 QuickCut *Eco*R I 限制性核酸内切酶,购自 TaKaRa 公司;5 000 bp DNA Marker,购自诺唯赞生物科技有限公司;核酸提取试剂盒、琼脂糖凝胶回收试剂盒和质粒 DNA 小提试剂盒,均购自美国 Axygen 公司;镍离子亲和层析蛋白纯化试剂盒和 His-tag 抗体,均购自碧云天生物公司;辣根过氧化物酶(HRP)标记的羊抗鼠 IgG,购自中衫金桥生物技术有限公司。

### 1.3 引物设计与合成

根据 GenBank 库里的 NS 全基因序列,针对 NS1 编码区设计 1 对特异性引物,引物两端分别引入 *Xho* I (碱基序列为 CTCGAG)、*Eco*R I (碱基序列为 GAATTC)酶切位点,此引物送至金斯瑞生物科技有限公司合成。引物序列:F:5'-CAAAGAATTCA TGGATTCCAACACT-3'(含 *Eco*R I 酶切位点),R:5'-TTTCCTCGAGCTACTTTGGAGAAA-3'(含 *Xho* I 酶切位点)。

### 1.4 目的基因的扩增与克隆

利用 RNA 提取试剂盒提取 H9N2 AIVs 的基因组,以提取的基因组为模板,用引物 R 进行反转录,所得产物为 cDNA,作为 PCR 扩增的模板。PCR 扩增体系为 50  $\mu$ L,2  $\times$  Taq Mix 25  $\mu$ L,上下游引物(10  $\mu$ mol/L)各 1  $\mu$ L,cDNA 3  $\mu$ L,超纯水 20  $\mu$ L。扩增程序为:94  $^{\circ}$ C 5 min;94  $^{\circ}$ C 30 s,52  $^{\circ}$ C 45 s,72  $^{\circ}$ C 3 min,10 个循环;94  $^{\circ}$ C 30 s,58  $^{\circ}$ C 45 s,72  $^{\circ}$ C 1 min,30 个循环;最后 72  $^{\circ}$ C 延伸 7 min。将扩增产物进行琼脂糖凝胶电泳,用胶回收试剂盒回收纯化阳性片段,与 pMD18-T 载体连接后,转化至大肠杆菌 DH5 $\alpha$ ,挑取阳性克隆进行序列测定,筛选出含有保真序列的 NS1 基因的克隆。

### 1.5 重组质粒的构建与鉴定

将筛选到的保真质粒 pMD18-T-NS1 与表达

载体 PET32a 进行双酶切,分别电泳鉴定并回收 PET32a 酶切质粒和 NS1 基因片段,将两者在 16  $^{\circ}$ C 连接 30 min 后转化至大肠杆菌 DH5 $\alpha$ ,挑取单克隆菌落扩大培养后提取质粒,对质粒进行 PCR 和双酶切鉴定。

### 1.6 NS1 蛋白的诱导条件优化

为摸索蛋白诱导表达的最佳条件,将构建成功的 PET32a 质粒转化到表达感受态细胞 BL21 中,鉴定为阳性的菌株进行扩大培养,37  $^{\circ}$ C 振荡培养至  $D_{600\text{ nm}}$  0.6~1.0,分别以不同浓度的 TPTG 和不同诱导时间来进行优化,根据 SDS-PAGE 的结果,确定最佳优化条件。

1.6.1 IPTG 最佳浓度的探索 在 5 管  $D_{600\text{ nm}}$  为 0.6~1.0 的 4 mL 菌液中加入不同量的 IPTG 使其终浓度分别为 0.0、0.1、0.5、1.0、2.0 mmol/L,37  $^{\circ}$ C,120 r/min 诱导 6 h,诱导结束后,8 000 r/s 离心 10 min,弃上清,1  $\times$  PBS 洗涤 3 遍后用 480  $\mu$ L PBS 重悬,取样本进行 SDS-PAGE 分析,根据结果确定 IPTG 最佳诱导浓度。

1.6.2 最佳诱导时间的探索 在培养基中加入终浓度为 2.0 mmol/L IPTG,分别诱导 2、4、6、8 h,对样品进行 SDS-PAGE 检测,根据电泳结果确定出最佳诱导时间。

### 1.7 重组蛋白的可溶性分析及纯化

挑取阳性单克隆于 4 mL LB 培养基中,37  $^{\circ}$ C 振荡培养过夜,第 2 天以 1:100 的比例扩大培养至菌液  $D_{600\text{ nm}}$  为 0.6~1.0,加入终浓度为 2 mmol/L 的 IPTG,37  $^{\circ}$ C、120 r/min 诱导表达 8 h 后 8 000 r/s 离心 10 min,弃上清,沉淀用 PBS 反复洗涤 3 次,重悬于 480  $\mu$ L PBS 中,间歇超声波冰浴破菌后,12 000 r/s 离心 10 min,分别对上清和沉淀进行 SDS-PAGE 检测。根据可溶性分析的结果,按照碧云天纯化试剂盒的步骤对蛋白进行纯化。

### 1.8 纯化蛋白的 Western blot 分析

将凝胶上的蛋白转至 PVDF 膜,转膜完成后加入含 5% 脱脂奶粉的 PBST 在 37  $^{\circ}$ C 培养箱中封闭 2 h,后与 1:1 000 稀释的 His 单克隆抗体 4  $^{\circ}$ C 反应过夜,用 PBST 洗涤 3 次,每次 5 min,再与辣根过氧化物酶标记的二抗在 37  $^{\circ}$ C 温箱中反应 1 h,用 PBST 洗涤 3 次后显色,进行免疫印记分析。

### 1.9 纯化蛋白的免疫原性分析

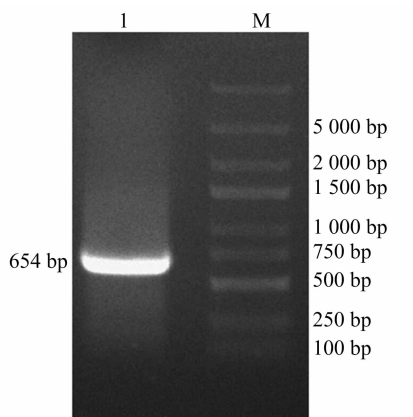
采用纯化的 NS1 重组蛋白多次免疫小鼠制备血清,以其作为一抗对感染 H9N2 禽流感病毒 8 h

的 MDCK 细胞进行免疫荧光试验,测定所制备的血清能否识别 H9N2 禽流感病毒在 MDCK 细胞复制过程中产生的 NS1 蛋白。

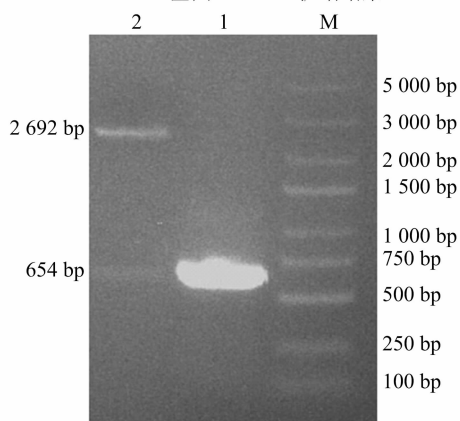
## 2 结果与分析

### 2.1 *NSI* 基因的 RT-PCR 扩增与保真克隆的筛选

提取 H9N2 AIVs 的基因组,用 NS1 引物进行 RT-PCR 扩增,由图 1 可知,该试验扩增出与预期大小一致的片段。将该片段进行胶回收后将产物连接到 pMD18-T 载体上,通过序列测定筛选出保真基因克隆。



A. *NSI* 基因 RT-PCR 扩增结果



B. 保真克隆质粒 pMD8-T-*NSI* 的 PCR 鉴定(泳道 1)与双酶切鉴定(泳道 2)结果

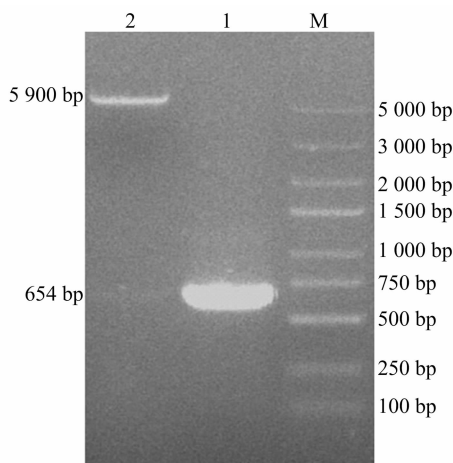
图1 *NSI* 基因的扩增与克隆

### 2.2 重组表达质粒的 PCR 与双酶切鉴定结果

对克隆质粒 pMD18-T-*NSI* 进行双酶切,将切下的 *NSI* 基因连接到原核表达载体 pET32a,然后对重组表达质粒进行 PCR 和双酶切鉴定。由图 2 可知,*NSI* 基因成功连接到质粒 pET32a,重组表达质粒构建成功,命名为 pET32a-*NSI*。

### 2.3 *NSI* 蛋白表达条件的优化

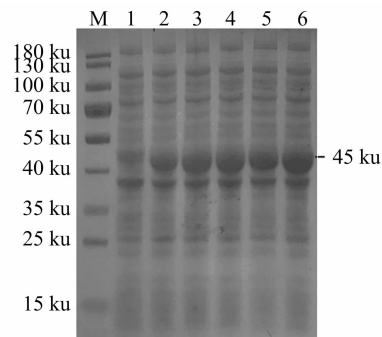
将构建好的重组质粒 pET32a-*NSI* 转化至表达



1—重组质粒 PCR 扩增结果; 2—重组质粒双酶切鉴定结果

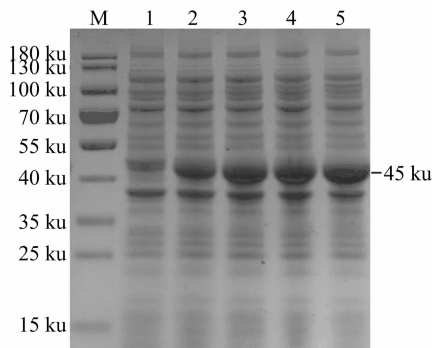
图2 重组表达质粒 PCR 与双酶切鉴定结果

感受态 BL21(DE3), 分别对 IPTG 的使用浓度和诱导时间进行最佳条件探索。由图 3、图 4 可知,最佳 IPTG 的使用浓度为 2 mmol/L,最佳诱导时间为 8 h。



M—蛋白质分子质量标准; 1—未诱导全菌; 2~6—IPTG 终浓度依次为 0.1、0.5、1.0、1.5、2.0 mmol/L

图3 不同浓度 IPTG 诱导后的菌体 SDS—PAGE 电泳结果

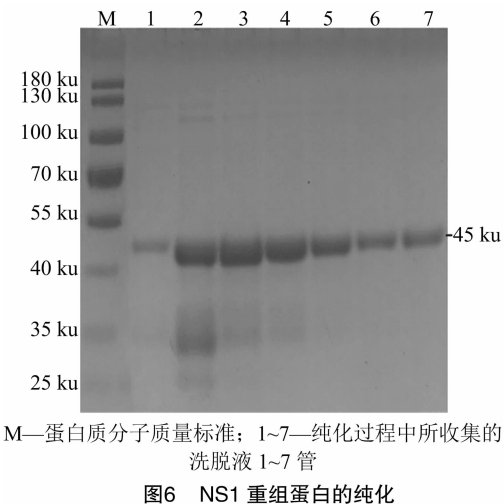
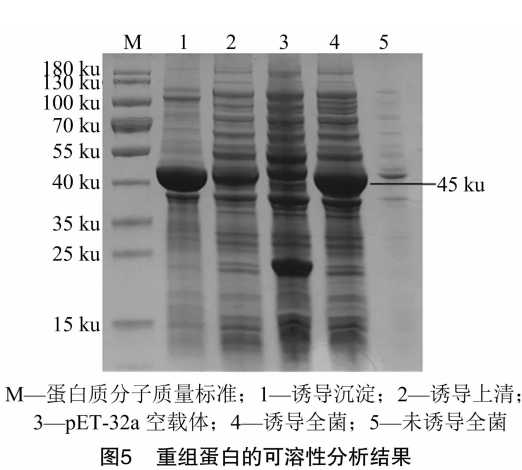


M—蛋白质分子质量标准; 1—未诱导全菌; 2~5—诱导时间依次为 2、4、6、8 h

图4 不同时间诱导后的 SDS—PAGE 电泳结果

### 2.4 表达产物的可溶性分析

确定重组蛋白的最佳诱导表达条件后,对重组蛋白进行大量表达,并对表达产物的可溶性进行分析。由图 5 可知,重组蛋白主要存在于细胞裂解沉淀中,即 *NSI* 重组蛋白在细胞中主要以包涵体的形



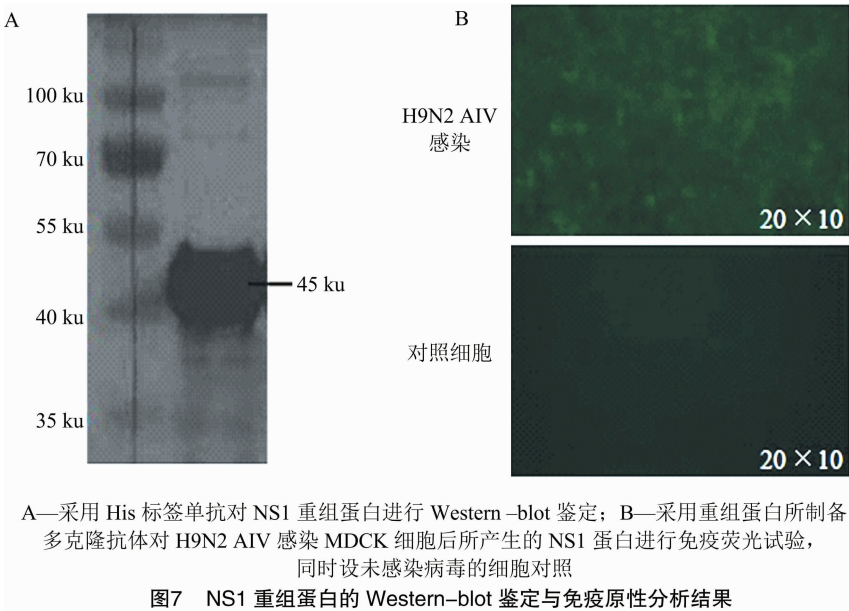
式存在。

### 2.5 NS1 重组蛋白的纯化与鉴定

由图 6 可知,将收集的包涵体用裂解液进行溶解,用镍离子亲和层析柱对溶解上清中的重组蛋白进行纯化,并对纯化后的重组蛋白进行 Western - blot 鉴定。由图 7 - A 可知,重组蛋白可以被抗 His 标签的单抗识别,提示 NS1 重组蛋白表达、纯化成功。

### 2.6 重组蛋白的免疫原性分析

采用纯化的 NS1 重组蛋白多次免疫小鼠制备血清,采用该抗体对感染 H9N2 AIV 的 MDCK 细胞进行免疫荧光试验。由图 7 - B 可知,所制备的多克隆抗体可以识别 H9N2 AIV 感染 MDCK 细胞后所产生的 NS1 蛋白,提示本试验所表达、纯化的 NS1 重组蛋白具有良好免疫原性。



## 3 讨论

H9N2 亚型禽流感病毒是最常见的低致病性禽流感病毒,最早于 1966 年从北美的火鸡体内分离到<sup>[17-18]</sup>;我国于 1994 年在广东某一鸡场首次分离出 H9 亚型禽流感病毒<sup>[19]</sup>;随后,该型禽流感在我国养禽地区呈大流行趋势。流行病学调查显示,H9

亚型禽流感病毒的主要宿主是野生水禽<sup>[20-21]</sup>,而家养水禽和鸡对 H9N2 AIVs 也易感,这些宿主在 H9N2 AIVs 向哺乳动物的跨物种传播中发挥重要作用。自 1999 年以来,我国不断有报道人感染 H9N2 亚型禽流感病毒的病例<sup>[22-23]</sup>,这使 H9N2 亚型禽流感受到广泛关注和高度重视。H9N2 亚型禽流感不仅给养禽业造成极大损失,也严重威胁到人类

健康,所以对 H9N2 亚型禽流感病毒的研究具有重要的公共卫生学意义。NS1 是甲型流感病毒的一种非结构多功能调节蛋白<sup>[24]</sup>,在流感病毒的致病性等方面发挥着重要的调节作用,对 NS1 蛋白进行深入研究有助于更好地理解流感病毒与宿主细胞间的相互作用,为揭示禽流感病毒的致病分子机制奠定了理论基础。

本研究利用 RT-PCR 技术扩增出 H9N2 AIVs 的 NS1 基因片段,连接 pMD18-T 载体进行克隆,然后将克隆的保真基因与载体 pET32a 连接,构建重组质粒 pET32a-NS1,并转化到 BL21(DE3)感受态细胞中进行诱导表达,确定最优的诱导表达条件,利用 His-tag 镍柱纯化重组蛋白,利用 SDS-PAGE 和 Western-blot 进行鉴定。结果显示,采用 pET32a 载体可在感受态 BL21(DE3)中进行 NS1 蛋白的表达,NS1 蛋白的表达量与诱导剂 IPTG 的浓度和诱导时间有一定相关性,当 IPTG 浓度为 2 mmol/L、诱导时间为 8 h 时,NS1 融合蛋白的表达量最大。由于 pET32a 带有 His 标签,所以本研究对融合蛋白用镍柱进行了纯化,并对纯化的融合蛋白用针对 His 标签的单克隆抗体进行了鉴定,结果表明融合蛋白可以与 His 单抗进行结合。而免疫荧光试验结果显示,利用纯化的重组蛋白制备的多克隆抗体可识别 H9N2 AIVs 在宿主细胞内产生的 NS1 蛋白。以上结果说明,本研究成功表达和纯化了 H9N2 禽流感病毒的 NS1 蛋白,并且重组 NS1 蛋白具有良好的免疫原性,这为下一步研究 NS1 蛋白的功能,以及以 NS1 蛋白为靶标的禽流感病毒临床感染的诊断和抗病毒药物的研制奠定了基础<sup>[25]</sup>。

#### 参考文献:

- [1] Zhang W, Wang C Y, Yang S T, et al. Inhibition of highly pathogenic avian influenza virus H5N1 replication by the small interfering RNA targeting polymerase A gene [J]. Biochemical and Biophysical Research Communications, 2009, 390(3): 421-426.
- [2] 王蕊. H5N1 型禽流感病毒 NS1 相互作用蛋白的筛选及验证 [D]. 沈阳: 辽宁大学, 2019.
- [3] Octaviani C P, Ozawa M, Yamada S, et al. Highlevel of genetic compatibility between swine[J]. Journal of Virology, 2010, 84(20): 10918-10922.
- [4] 郑方亮, 朱春玉, 商玲玲, 等. H5N1 亚型禽流感病毒 NS1 基因截短体的克隆与原核表达 [J]. 微生物学杂志, 2012, 32(3): 1-6.
- [5] 孙博兴. H9N2 亚型禽流感非结构蛋白 NS1A 基因的克隆、表达及其诱导 Hela 细胞凋亡的研究 [D]. 长春: 吉林大学, 2005.
- [6] Krug R M, Yuan W M, Noah D L, et al. Intracellular warfare between human influenza viruses and human cells: the roles of the viral NS1 protein [J]. Virology, 2003, 309(2): 181-189.
- [7] Das K, Ma L C, Xiao R, et al. Structural basis for suppression of a host antiviral response by influenza A virus [J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2008, 105(35): 13093-13098.
- [8] 刘瑞寒, 朱汝南, 钱渊. 甲型流感病毒非结构蛋白 NS1 功能研究进展 [J]. 微生物与感染, 2019, 14(1): 39-45.
- [9] Ayllon J, García-Sastre A. The NS1 protein: A multitasking virulence factor [M]//Current topics in microbiology and immunology. Cham: Springer International Publishing, 2014: 73-107.
- [10] Hale B G, Barclay W S, Randall R E, et al. Structure of an avian influenza A virus NS1 protein effector domain [J]. Virology, 2008, 378(1): 1-5.
- [11] 金鑫, 迟莹, 苏川. A 型流感病毒非结构蛋白 NS1 的研究进展 [J]. 江苏预防医学, 2014, 25(6): 34-36.
- [12] Xu K M, Smith G J D, Bahl J, et al. The genesis and evolution of H9N2 influenza viruses in poultry from Southern China, 2000 to 2005 [J]. Journal of Virology, 2007, 81(19): 10389-10401.
- [13] 贺番, 曹瑞兵, 郝永清. 禽流感病毒非结构蛋白 NS1 的分子生物学特性与功能 [J]. 动物医学进展, 2007, 28(4): 89-92.
- [14] Guan Y, Poon L L M, Cheung C Y, et al. H5N1 influenza: a protean pandemic threat [J]. PNAS, 2004, 101(21): 8156-8161.
- [15] Ehrhardt C, Wolff T, Pleschka S, et al. Influenza A virus NS1 protein activates the PI3K/Akt pathway to mediate antiapoptotic signaling responses [J]. Journal of Virology, 2007, 81(7): 3058-3067.
- [16] Suarez D L. Overview of avian influenza DIVA test strategies [J]. Biologicals, 2005, 33(4): 221-226.
- [17] 刘瑞寒, 朱汝南, 钱渊. 甲型流感病毒非结构蛋白 NS1 功能研究进展 [J]. 微生物与感染, 2019, 14(1): 39-45.
- [18] 徐丹雯. H9N2 亚型禽流感病毒的序列分析及其生物学特性研究 [D]. 扬州: 扬州大学, 2016.
- [19] 陈伯伦, 张泽纪, 陈伟斌. 禽流感研究 I. 鸡 A 型禽流感病毒的分离与血清学初步鉴定 [J]. 中国兽医杂志, 1994, 30(10): 5-7.
- [20] 孟芳, 徐怀英, 张伟, 等. 近 20 年中国部分地区鸡源 H9N2 亚型禽流感病毒 HA 基因遗传演化及其变异频率 [J]. 微生物学报, 2016, 56(1): 35-43.
- [21] 郭元吉, 李建国, 程小雯, 等. 禽 H9N2 亚型流感病毒能感染人的发现 [J]. 中华实验和临床病毒学杂志, 1999, 13(2): 105-108.
- [22] Peiris M, Yuen K, Leung C, et al. Human infection with influenza H9N2 [J]. The Lancet, 1999, 354(9182): 916-917.
- [23] Yuan R Y, Liang L J, Wu J E, et al. Human infection with an avian influenza A/H9N2 virus in Guangdong in 2016 [J]. The Journal of Infection, 2017, 74(4): 422-425.
- [24] Tumpey T M, Alvarez R, Swayne D E, et al. Diagnostic approach for differentiating infected from vaccinated poultry on the basis of antibodies to NS1, the nonstructural protein of influenza A virus [J]. Journal of Clinical Microbiology, 2005, 43(2): 676-683.
- [25] 娄文静, 张道军, 史云, 等. H7N9 亚型禽流感病毒非结构蛋白 1(NS1) 基因序列分析及 2013 上海分离株 NS1 的原核表达 [J]. 生物技术通讯, 2014, 25(5): 664-668.