

日本脑炎病毒 WHe 株 NS1 基因的 克隆、测序及表达

乔宪凤¹, 唐青海², 郑新民¹, 熊忠良¹, 刘西梅¹,
华文君¹, 周荆荣¹, 何维明²

(1 湖北省农业科学院 畜牧兽医研究所 湖北省动物胚胎工程及分子育种重点实验室, 湖北 武汉 430064;

2 西北农林科技大学 动物科技学院, 陕西 杨凌 712100)

[摘 要] 以日本脑炎病毒(Japanese encephalitis virus, JEV) WHe 株的基因组 RNA 为模板, 采用 RT-PCR 技术, 克隆了 JEV WHe 株的 NS1 基因, 并对其进行了测序和序列分析。构建了 pET28b-NS1 表达载体, 转化表达宿主大肠杆菌 BL21(DE3), 并对其进行了诱导表达, 对表达产物进行检测。结果表明, NS1 基因全长 1 145 bp, 其核苷酸序列与 JEV P3 株同源率为 99.4%, 与 SA14 和 SA14-14-2 等 27 个 JEV 毒株的核苷酸序列同源率为 98%, 表明 NS1 基因的保守性很高; pET28b-NS1 表达产物的相对分子质量约为 43 ku, 大小与预期结果相符。NS1 基因克隆表达成功。

[关键词] 日本脑炎; WHe 株; NS1 基因; RT-PCR

[中图分类号] S852.65+9.6

[文献标识码] A

[文章编号] 1671-9387(2007)04-0023-04

Cloning, sequencing and expression of nonstructural protein NS1 of Japanese encephalitis virus strain WHe

QIAO Xian-feng¹, TANG Qing-hai², ZHENG Xin-min¹, XIONG Zhong-liang¹,
LIU Xi-mei¹, HUA Wen-jun¹, ZHOU Jing-rong¹, HE Wei-ming²

(1 Hubei Academy of Agriculture Science, Hubei Key Lab of Animal Embryo & Molecular Breeding, Wuhan, Hubei 430064, China;

2 College of Animal Science and Husbandry, Northwest A & F University, Yangling, Shaanxi 712100, China)

Abstract: Genomic RNA was separated from JEV WHe strain, and used as template for cDNA synthesis of NS1 gene. Then NS1 gene (1 145 bp) was amplified by RT-PCR. The analysis of sequence showed the nucleotide sequence of NS1 had the 99.4% identities with that of JEV P3 strain, and 98% identities with the NS1 reported in other 27 strains. Then the NS1 was cloned into the expression vector pET 28b (+) to construct a recombinant prokaryotic expression plasmid, pET 28b(+) NS1, and the recombinant plasmid was then transfected into E. coli BL21(DE3). SDS PAGE electrophoresis showed the relative molecular weight of the expressed protein was about 43 ku in accordance with the presupposition.

Key words: Japanese encephalitis virus; WHe strain; NS1 gene; RT-PCR

日本脑炎是一种由蚊虫传播的中枢神经系统病毒性人畜共患传染病, 由日本脑炎病毒 (Japanese encephalitis virus, JEV) 引起, 主要流行于东亚和东

南亚各国, 近年来流行分布范围不断扩大。我国是世界上日本脑炎发病人数最多的国家, 占世界发病人数的 80% 以上^[1]。猪是日本脑炎的主要传染源,

[收稿日期] 2006-03-06

[基金项目] 湖北省自然科学基金项目 (2005ABA195)

[作者简介] 乔宪凤 (1968—), 女, 黑龙江鸡西人, 副研究员, 主要从事分子病毒学研究。

其患病主要症状为怀孕母猪流产、产死胎、产弱仔,公猪睾丸炎及少数仔猪呈神经症状,常给养猪业造成巨大的经济损失。

JEV 属于黄病毒科黄病毒属,其核酸为单股正链 RNA,长度约为 11 kb,由 5' 端非编码区(5'-NCR)和一个几乎跨越整个基因组的单一开放阅读框(ORF)和 3' 端非编码区(3'-NCR)构成,无亚基因组结构。JEV 基因编码的蛋白顺序为: C-preM/M- E-NS1-NS2A-NS2B-NS3-NS4A-NS4B-NS5^[2-3],其中核心蛋白 C、囊膜蛋白 M(由前期膜蛋白 preM 水解而来)和囊膜糖蛋白 E 是 JEV 的结构蛋白^[4-5],NS1~NS5 为非结构蛋白。NS1 基因长度为 1 056 bp,编码 352 个氨基酸。NS1 蛋白是一种分泌型糖蛋白,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^[5-8]。本研究以从武汉地区分离的 JEV WHe 毒株为材料,对其 NS1 基因进行了克隆、鉴定及测序,构建了重组原核表达质粒,并在大肠杆菌中进行了高效表达,为 JEV 基因工程疫苗的研制奠定了基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 病毒、菌株及试验动物 JEV WHe 强毒株,由湖北省农业科学院畜牧兽医研究所兽医室分离鉴定;DH5 α 和 BL(DE3)大肠杆菌由湖北省农业科学院畜牧兽医研究所生物室保存;14 日龄昆明小鼠,购自湖北省疾病预防控制中心动物室,共 10 只,质量 8~9 g,雌雄随机。

1.1.2 主要仪器及试剂 PCR 仪(美国 Amp-gene9600 产品),电泳仪、凝胶成像系统(美国 Bio-Rad 公司产品),高速冷冻离心机(德国 Eppendorf 5810R 产品)。RIzolR 试剂为 Invitrogen 公司产品,玻璃奶回收试剂盒为 Biostar 公司产品,M-MLV 反转录酶、Taq 酶、Xho I、Pst I、Nco I 和 BamH I 为 Promega 公司产品,pUCm-T 载体为上海生工产品;质粒小量制备试剂盒为 Bioteke 公司产品。

1.2 引物的设计与合成

参考 GenBank 发表乙脑疫苗株 SA14 的核苷酸序列(GenBank 登陆号为:U14163),用 Primer Priemer 5.0 软件设计 3 条引物:

F1: 5'-AGACTGGCATGGTGACGGAGGA-3' (3 975~3 996 bp);

上游引物 P1: 5'-GCACCATGGGCGTCAACGCA-3' (2 388~2 402 bp);

下游引物 P2: 5'-GCGGATCCTAAGCATCAAC-CTGTGA-3' (3 519~3 533 bp)。

引物由 Invitrogen 公司合成。

1.3 JEV WHe 株 RNA 的提取

用 PBS 溶解 WHe 株乙脑病毒干粉,脑内接种 14 日龄昆明乳鼠,每只注射 20 μ L,接种后挑取第 96~120 h 出现明显神经症状的小鼠,无菌采取其脑组织,以每 40 mg 鼠脑组织加 1 mL TRIzol 试剂的比例与 TRIzol 试剂混合,按试剂说明书操作步骤提取 JEV RNA,沉淀的 RNA 加入 1.0 mL 体积分数 75%乙醇,-20 $^{\circ}$ C 保存备用。

1.4 JEV WHe 株 NS1 基因的 RT-PCR 扩增

1.4.1 RT 反应 取 1 支 Eppendorf 管,依次加入 1~2 μ g 总 RNA,1.5 μ L F1 引物(20 μ mol/L),1.0 μ L RNasin,5 μ L 5 $\times$ reaction buffer,1.5 μ L dNTP(10 mol/L),2.0 μ L M-MLV (200 U/ μ L),ddH₂O 3.0 μ L。在 PCR 仪中进行 cDNA 合成,作为下一步 PCR 扩增的模板。反应程序为:42 $^{\circ}$ C 60 min,95 $^{\circ}$ C 5 min,4 $^{\circ}$ C 保存。

1.4.2 PCR 反应 PCR 反应体系为 25 μ L: 2.5 μ L 10 $\times$ reaction buffer,10 μ L dNTP(1 mmol/L),上、下游引物(20 μ mol/L)各 1.5 μ L,3 μ L cDNA 模板,2.0 U Taq 聚合酶。反应条件为:94 $^{\circ}$ C 预变性 3 min;94 $^{\circ}$ C 变性 30 s,57 $^{\circ}$ C 退火 45 s,72 $^{\circ}$ C 延伸 2 min,30 个循环;72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min。PCR 产物进行 10 g/L 琼脂糖电泳鉴定,溴化乙锭染色,凝胶成像系统观察电泳结果。

1.5 JEV WHe 株 NS1 基因 RT-PCR 扩增产物鉴定

用玻璃奶试剂盒回收 NS1 基因,与 TA 克隆 pUCm-T 载体 4 $^{\circ}$ C 连接过夜,连接反应体系为: T4 DNA ligase 10 $\times$ buffer 1 μ L, pUCm-T(50 ng/ μ L) 1 μ L, T4 ligase(3 U/ μ L) 1 μ L, DNA 3 μ L,ddH₂O 4.0 μ L。取连接产物 5 μ L 转化感受态 DH5 α ,涂布含 50 μ g/mL Amp 抗生素的 LB 琼脂平板,置 37 $^{\circ}$ C 温箱培养 12~18 h。用兰白斑初步筛选,挑取白斑单个菌落,接种含 50 μ g/mL Amp 的 LB 液体培养基,在 37 $^{\circ}$ C 200 r/min 的摇床上培养 12~16 h 后,用质粒小量制备试剂盒提取纯化质粒,进行 Xho I 和 Pst I 双酶切鉴定,将阳性克隆质粒命名为 pUC-NS1,并送 Invitrogen 公司序列测定。

1.6 JEVWHe 株 NS1 基因及 NS1 蛋白序列分析

将 NS1 基因的核苷酸序列及据其推导的氨基酸序列与 GenBank 收录的其他 JEV 株序列进行对比,使用 Vector NTI 软件进行同源性分析。

1.7 JEV WHe 株 NS1 基因 pET28b-NS1 原核表达质粒的构建及鉴定

测序验证后,用 *Nco* I 和 *Bam* H I 双酶切 pUC-NS1,得到自带起始密码子和终止密码子的完整的 NS1 基因。用 *Nco* I 和 *Bam* H I 双酶切 pET-28b(+)质粒 DNA。将 pUCNS1 和 pET-28b(+)双酶切产物分别进行 10 g/L 琼脂糖电泳,并用 DNA 胶内回收试剂盒回收目的产物,溶于 10 μ L 灭菌去离

子水,4 $^{\circ}$ C 连接过夜,构建原核表达质粒 pET28b-NS1。连接反应体系: T4 DNA ligase 10 $\times$ buffer 1 μ L, pET-28b(+) 1 μ L, T4 ligase(3 U/ μ L) 1 μ L, DNA 3 μ L, ddH₂O 4.0 μ L。取连接产物 5 μ L,转化感受态 DH5 α ,接种于卡那霉素(Kan)抗性平板上,挑取单菌落,小量提质粒后进行 *Nco* I 和 *Bam* H I 双酶切鉴定。JEV NS1 基因原核表达质粒 pET28b-NS1 的构建策略见图 1。

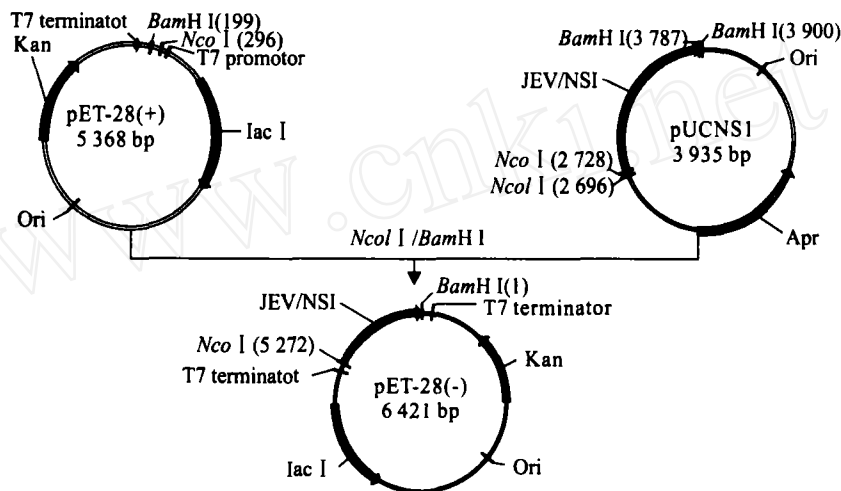


图1 JEV NS1 基因原核表达质粒 pET28b-NS1 的构建示意图

Fig. 1 Construction of recombinant plasmid pET28b-NS1

1.8 pET28b-NS1 的转染与诱导表达

取鉴定好的原核表达质粒 pET28b-NS1 10 μ L,转化 200 μ L 大肠杆菌 BL21(DE3)感受态细胞,然后涂布 LB 琼脂平板(含 Kan 抗生素 50 μ g/mL),挑菌、扩大培养、酶切鉴定等一系列操作与 1.6 节 pET28b-NS1 鉴定相同。将鉴定好的含 pET28b-NS1 的 BL21(DE3)菌液按 1:100(体积比)加入含有 Kan 的 LB 液体培养基中,37 $^{\circ}$ C 200 r/min 摇床上培养至 OD₆₀₀ 值为 0.4~0.6(约 2 h),加入 IPTG 至终浓度 1.0 mmol/L,30 $^{\circ}$ C 继续振荡培养,4 h 后收集沉淀菌体。同时设 pET 28b(+)/BL21 未诱导对照和 BL21 对照。

1.9 pET28b-NS1 表达产物的 SDS-PAGE 检测

取诱导表达菌液各 1 mL,12 000 r/min 离心 1 min,弃上清,收集诱导表达的菌体,加 100 μ L 1 $\times$ SDS-PAGE凝胶电泳上样缓冲液重悬,沸水浴 3 min,参照文献[9]进行 SDS-PAGE 检测。

2 结果与分析

2.1 JEV WHe 株 NS1 基因 RT-PCR 扩增结果

从感染 JEV WHe 株的鼠脑中成功地提取 JEV

基因组 RNA,以此为模板进行 RT-PCR,琼脂糖凝胶电泳检测结果显示,在约 1.2 kb(1 145 bp)处有一电泳带(图 2),与预期相符。表明该扩增产物包括了 NS1 基因上游的 E 基因 C 末端 90 个核苷酸。

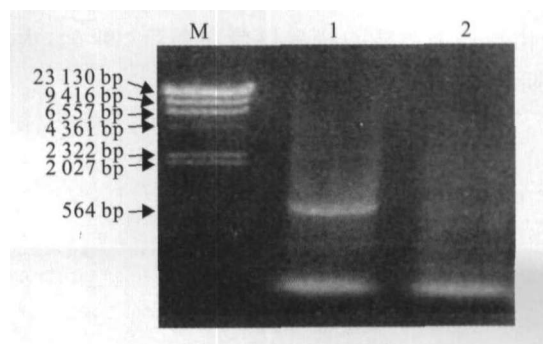


图2 JEV WHe 株 NS1 基因的 RT-PCR 扩增产物电泳图

M. λ DNA/*Hind* III Markers; 1. RT-PCR 产物; 2. 阴性对照

Fig. 2 Amplification results of NS1 gene of WHe strain

M. λ DNA/*Hind* III Markers; 1. RT-PCR product of NS1 gene; 2. Negative Control

2.2 JEV WHe 株 NS1 基因核苷酸及其推导的氨基酸序列分析

测序结果表明, NS1 基因 cDNA 长度为 1 056 bp,编码 352 个氨基酸残基。序列分析结果显示,

WHe 株 NS1 基因核苷酸序列与 P3 株的相似性为 99.4%, 仅有 6 个核苷酸差异, 其编码的氨基酸序列与 P3 株的同源性达 100%; 与 Nakayama、JEV-at222 和 Vellore P20778 等 10 株的氨基酸序列的相似性达 100%; 与 SA14、SA14-14-2 等 27 个毒株的核苷酸序列同源性均为 98%, 氨基酸序列的同源性高达 99.7%。表明 WHe 株的 NS1 基因已经克隆成功, 该基因在 JEV 不同毒株中保守性很高。

2.3 pET28b- NS1 的鉴定结果

pET28b- NS1 *Nco* I 单酶切产物长度为 6 421 bp, *Nco* I 和 *Bam*H I 双酶切产物长度为 5.37 和 1.14 kb(图 3)。测序结果显示, 读码框完全正确。

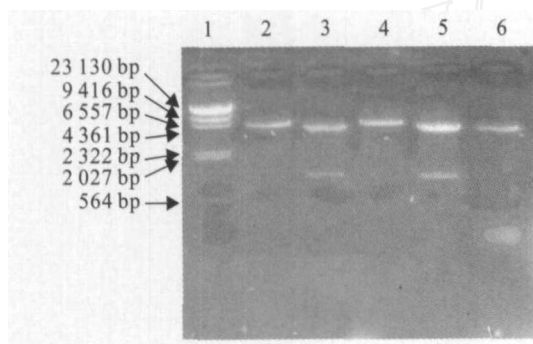


图 3 pET28b- NS1 酶切鉴定图

1. lambda DNA/*Hind* III Marker; 2, 4. pET28b-NS1/*Nco* I;
3, 5. pET28b-NS1/*Nco* I + *Bam*H I; 6. pET-28b(+)/*Bgl* II

Fig. 3 Identification of recombinant plasmid pET28b-NS1

2.4 pET28b-NS1 表达产物的 SDS-PAGE 检测结果

JEV WHe 株 NS1 基因原核表达质粒 pET28b-NS1 表达产物的 SDS-PAGE 电泳结果显示, 在 43 ku 处出现一条明显的特异性蛋白条带(图 4), 大小与预期结果相符。

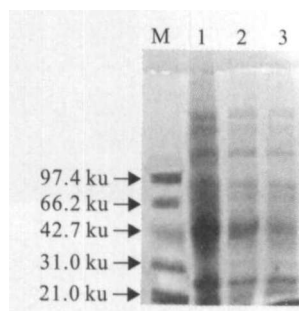


图 4 pET28b-NS1 诱导表达产物的 SDS-PAGE 电泳图

M. marker; 1. 未转化 pET28b-NS1 的 BL21(DE3);
2. IPTG 诱导的 pET28b-NS1; 3. IPTG 诱导的 pET-28b(+)

Fig. 4 Expression of the combinant NS1 protein
in *E. coli* analyzed by SDS PAGE

M. marker; 1. BL21(DE3) pLysS without pET28b-NS1; 2. pET28b-NS1 induced with IPTG; 3. pET-28b(+)-without IPTG

3 讨论

本研究的 JEV WHe 株是从武汉地区两个规模化猪场的母猪流产胎儿脑组织分离鉴定到的 1 株地方性 JEV 强毒株。本试验根据 GenBank 中的 JEV 野生型 SA14 株的全基因序列设计了一条第一链引物 F1(与 JEV 基因组的 3 975~3 996 bp 区互补), 并以提取的 WHe 株基因组 RNA 为模板, 反转录了 WHe 株 1~3 996 bp 区的 cDNA。随后用引物 P1、P2 扩增了 WHe 株的 NS1 基因(JEV 基因组的 2 388~3 533 bp 区, 包括完整 NS1 基因及其上游的 E 基因 C 末端 90 个核苷酸), 其长度为 1 145 bp。

NS1 蛋白的相对分子量约为 40 ku, 是分泌型糖蛋白, 本试验表达的 NS1 蛋白质的相对分子量约为 43 ku, 推测这是由于其包含了 NS1 上游 E 蛋白 C 末端 30 个氨基酸所致。NS1 常以同二聚体形式存在于培养液和血清中, 形成的二聚体对热极敏感, 煮沸可使二聚体转变为单体。有研究表明, NS1 以这种高分子质量形式出现是黄病毒感染的一个特点^[10]。NS1 可能在病毒组装和释放中起作用, 是病毒的主要抗原成分之一, 具有可溶性补体结合活性。NS1 不组成毒粒, 没有中和活性和血凝抑制活性, 但是其可在不出现中和抗体的情况下, 诱导保护性免疫, 通过补体依赖途径水解被 JEV 侵染的细胞^[11]。用 NS1 作疫苗, 因其没有常规疫苗抗体的依赖性而引起人们的极大关注, 并且把它作为研制亚单位疫苗的良好材料^[1], 现在常用于 JEV 各类疫苗的开发。Gibson 等^[12]研究表明, 黄病毒的主要免疫原性基因 NS1 高度保守, 其核酸序列可适用于 7 种黄病毒(包括 JEV 在内), 并有可能成为具有广泛作用的黄病毒亚单位疫苗。

本研究将 pET28b(+)-NS1 重组质粒转化表达宿主大肠杆菌 BL(DE3), 成功地表达了 NS1 基因, 表达的 NS1 蛋白相对分子质量为 43 ku, 结果为 JEV NS1 单克隆抗体的制备、基因工程疫苗的研发奠定了基础。

[参考文献]

- [1] 俞永新. 流行性乙型脑炎的全球流行动态及控制策略[J]. 中国公共卫生, 2000, 16(6): 567-569.
- [2] 项秉懿, 陈苏民. 乙型脑炎病毒的分子生物学研究进展[J]. 中国病毒学报, 1993, 8(3): 199-206.

(下转第 31 页)

中和术后死亡。关中奶山羊的利用年限为5~7年,在人工角膜移植后可长期饲养,有利于长时间观察人工角膜移植后眼睛的恢复状况。因此,关中奶山羊是角膜移植基础研究的理想试验动物模型。本试验采用羊膜负载关中奶山羊角膜缘细胞构建组织工程化人工角膜上皮,结果显示构建的人工角膜上皮与正常的角膜结构相似,说明用该方法构建的人工角膜上皮可以为关中奶山羊的自体角膜移植提供移植材料,为用关中奶山羊作为试验动物模型来研究人工角膜在角膜移植中的应用奠定了基础。

[参考文献]

- [1] Harkin D G, Barnard Z, Gillies P, et al. Analysis of p63 and cytokeratin expression in a cultivated limbal autograft used in the treatment of limbal stem cell deficiency[J]. Br J Ophthalmol, 2004, 88: 1154-1158.
- [2] Djalilian A R, Mahesh S P, Koch C A, et al. Survival of donor epithelial cells after limbal stem cell transplantation[J]. Investigative Ophthalmology and Visual Science, 2005, 46: 803-807.
- [3] Du Y, Chen J, Funderburgh J L, et al. Functional reconstruction of rabbit corneal epithelium by human limbal cells cultured on amniotic membrane[J]. Mol Vis, 2003, 9: 635-643.
- [4] Kim H, Oh Y. The effect of limbal transplantation versus amniotic membrane transplantation on limbal damaged rabbit cornea[J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2003, 44: 904.
- [5] Sangwan V S, Matalia H P, Vemuganti G K, et al. Early results of penetrating keratoplasty after cultivated limbal epithelium transplantation[J]. Arch Ophthalmol, 2005, 123(3): 334-340.
- [6] Pellegrini G, Traverso C E, Franzini A T, et al. Long-term restoration of damaged corneal surfaces with autologous cultivated corneal epithelium[J]. Lancet, 1997, 349(9057): 990-993.
- [7] Yeh L K, Chen W L, Li W, et al. Soluble lumican glycoprotein purified from human amniotic membrane promotes corneal epithelial wound healing[J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2005, 46(2): 479-486.
- [8] Li H C, Niederkorn J Y, Neelam S, et al. Immunosuppressive factors secreted by human amniotic epithelial cells[J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2005, 46(3): 900-907.
- [9] Avila M, Espana M, Moreno C, et al. Reconstruction of ocular surface with heterologous limbal epithelium and amniotic membrane in a rabbit model[J]. Cornea, 2001, 20(4): 414-420.
- [10] Grueterich M, Espana E M, Tseng SCG. Ex vivo expansion of limbal epithelial stem cells; Amniotic membrane serving as a stem cell niche[J]. Surv Ophthalmol, 2003, 48(6): 631-646.
- [11] Nakamura T, Koizumi N, Tsuzuki M, et al. Successful re-grafting of cultivated corneal epithelium using amniotic membrane as a carrier in severe ocular surface disease[J]. Cornea, 2003, 22(1): 70-71.
- [12] Ramaesh K, Dhillon B. Ex vivo expansion of corneal limbal epithelial/stem cells for corneal surface reconstruction[J]. Eur J Ophthalmol, 2003, 13(6): 515-524.

(上接第26页)

- [3] McAda P C, Mason P W, Schamljohn C S, et al. Partial nucleotide sequence of the Japanese encephalitis virus. [J]. General virol, 1987, 158: 348-360.
- [4] Briton M A. Replication of flaviviruses [M]. New York: Plenum press, 1986: 327-374.
- [5] Kimura J, Yasui K. Protection of mice against Japanese encephalitis virus by passive administration with monoclonal antibodies[J]. Immunol, 1988, 141: 3606-3610.
- [6] Konishi E, Yamaoka M, Kurane I, et al. Japanese encephalitis DNA vaccine candidates expressing premembrane and envelope genes induce virus-memory B cells and long-lasting antibodies in swine[J]. Virology, 2000, 268(1): 49-55.
- [7] Monath T P, Heinz F X, Fields N, et al. Fields virology [M]. 3 edition. Philadelphia, Pa: Lippincott-Raven Publishers, 1996: 961-1034.
- [8] 姜元梅, 刘启富, 朱德钟, 等. 乙型肝炎重组痘苗病毒的抗原表达及其免疫保护性[J]. 病毒学报, 1995, 11(4): 317-312.
- [9] Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis F. Molecular cloning, A laboratory manual [M]. 2nd ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.
- [10] Winkler G, Randolph V B, Cleaves G B. Evidence that the mature form of the flavivirus nonstructural protein NS1 is a dimer[J]. Virology, 1988, 162: 187-196.
- [11] Lin Y L, Chen L K, Liao C L, et al. DNA immunization with Japanese encephalitis virus nonstructural protein NS1 elicits protective immunity in mice[J]. Virology, 1998, 72(1): 191-200.
- [12] Gibson C A, Schlesinger J J, Barrett A D. Prospects for a virus non-structure protein as a subunit vaccine[J]. Vaccine, 1988, 6(1): 7-9.