

牛病毒性腹泻病毒 NS3 基因的序列分析、表达与抗原性鉴定

李岩, 聂明非, 魏伟, 温凯, 贾莹, 霍慧, 王君伟

东北农业大学动物医学学院, 哈尔滨 150030

摘要: 本研究应用套式 RT-PCR 方法扩增出牛病毒性腹泻病毒 VEDEVAC 株编码 NS3 蛋白的基因, 克隆至表达载体 pET-30a(+), 并进行测序。对瘟病毒属病毒 NS3 基因进行氨基酸差异性分析, 显示平均 P-distance 为 0.07, 系统进化树分析表明 VEDEVAC 株隶属于 BVDV 1 型。将构建成功的重组质粒转化大肠埃希氏菌 Rosetta(DE3), 在 IPTG 诱导下表达 NS3 重组蛋白, 经 Ni-NTA 亲和层析纯化和尿素梯度透析后进行反应原性鉴定。Western blotting 结果显示表达的重组蛋白可以与牛病毒性腹泻病毒阳性血清反应, 并与猪瘟阳性血清有交叉反应, ELISA 结果显示该重组蛋白具有良好的反应原性。所获得的蛋白为建立针对 NS3 抗体的 ELISA 检测方法奠定了基础。

关键词: 牛病毒性腹泻病毒, NS3 蛋白, 差异性分析, 进化树, 抗原性

Sequence analysis, expression and antigenicity detection of bovine viral diarrhea virus NS3 gene

Yan Li, Mingfei Nie, Wei Wei, Kai Wen, Ying Jia, Hui Huo, and Junwei Wang

College of Veterinary Medicine, Northeast Agricultural University, Harbin 150030, China

Abstract: In this study, we cloned the NS3 gene from bovine viral diarrhea virus (BVDV) VEDEVAC strain. The result showed that the average P-distance of Pestivirus NS3 amino acid sequence was 0.07 and the VEDEVAC strain was classified to BVDV type 1. Using pET-30a(+) as vector and *Escherichia coli* Rosetta (DE3) as host, we obtained purified recombinant NS3 protein by Ni-NTA affinity chromatography. Western blotting analysis demonstrated that both BVDV positive serum and classical swine fever virus (CSFV) positive serum were able to recognize the recombinant NS3 protein. Indirect-ELISA assay indicated that the protein could be used as detection antigen.

Keywords: bovine viral diarrhea virus, NS3 protein, divergence analysis, phylogenetic tree, antigenicity

牛病毒性腹泻病毒 (Bovine viral diarrhea virus) 隶属于黄病毒科 (Flaviridae)、瘟病毒属 (Pestivirus)。该病毒可以造成牛只的持续性感染, 并且不表现出显著的症状, 也可引发牛病毒性腹泻 (Bovine viral

diarrhea, BVD), 临床表现为白细胞减少、黏膜糜烂溃疡、腹泻及怀孕母牛流产或产出畸形胎。该病的流行已经给世界养牛业造成了巨大的经济损失^[1]。

BVDV 为单股正链 RNA 病毒, 全长约 12.3~

Received: July 8, 2009; Accepted: January 11, 2010

Supported by: The Earmarked Fund for Modern Agro-industry Technology Research System (No. NYCYTX-0303).

Corresponding author: Junwei Wang. Tel: +86-451-55191244; Fax: +86-451-55191672; E-mail: jwwang@neau.edu.cn

现代农业产业技术体系建设专项资金 (No. NYCYTX-0303) 资助。

12.5 kb, 除 5'非翻译区 (5'-UTR) 和 3'非翻译区 (3'-UTR) 外, 由一个开放阅读框编码 C、E^{ms}、E1、E2 四种结构蛋白和 N^{pro}、P7、NS2、NS3、NS4A、NS4B、NS5A、NS5B 八种非结构蛋白^[2]。与大多数 RNA 病毒相同, BVDV 各毒株之间存在广泛的基因多样性和致病性差异。根据 BVDV 基因组的差异, BVDV 分为 BVDV 1 型和 BVDV 2 型, 根据其是否能够产生明显的细胞病变分为致细胞病变 (CP) 和非致细胞病变 (NCP) 两种生物型^[3-4]。

编码 NS3 蛋白的基因在瘟病毒属内保守, 行使相似的功能, 在病毒增殖过程中, NS3 蛋白出现在内质网中, 直接参与病毒蛋白的加工过程。该蛋白具有蛋白酶活性 (Protease) 和解旋酶活性 (Helicase)。其丝氨酸蛋白酶活性及其核苷三磷酸酶/解旋酶 (NTPase/helicase) 活性分别位于其 N 端的 1/3 区和 C 端的 2/3 区, 二者位于 NS3 蛋白多肽上两个独立的功能结构区。作为丝氨酸蛋白酶, NS3 蛋白酶活性中心由 N 端的 3 个不连续的氨基酸残基 (His、Asp、Ser) 组成, 活性依赖于其蛋白结构的完整性, 其活性部位主要在 NS3 编码区的 N 端, 但 C 端缺失也可使酶活性丧失。丝氨酸蛋白酶的关键催化残基 Ser 的突变可致丝氨酸蛋白酶活性丧失, 但仍具有 ATPase 活性, 前者主要负责病毒多聚蛋白的翻译后加工, 产生成熟的病毒蛋白, 是病毒自我复制的前提条件, 而 NTPase/helicase 则主要参与病毒 RNA 的复制过程^[5-8]。

同时 NS3 蛋白具有较高的免疫原性, 在病毒感染过程中, 免疫系统的 CD4⁺ T 细胞主要识别 NS3 和 E2 两种蛋白, 并可诱导免疫细胞产生针对该蛋白的抗体。因此检测 NS3 蛋白抗体水平可以作为检测牛病毒性腹泻病毒感染的有效指标之一。鉴于此, 本研究扩增 VEDEVAC 株 NS3 基因后进行序列分析并表达完整 NS3 蛋白进行了抗原性鉴定。

1 材料与方 法

1.1 材料

1.1.1 质粒、菌株和血清

牛病毒性腹泻病毒 VEDEVAC 株、*E. coli* TG1

和 *E. coli* Rosetta(DE3) 由本实验室保存。pET-30a(+) 购自 Novagen 公司。BVDV 检测用标准阳性参考血清购自中国兽医药品监察所。猪瘟病毒 (CSFV) 阳性血清由中国农业科学院哈尔滨兽医研究所馈赠。HRP 标兔抗牛 IgG 购自西格玛奥德里奇 (上海) 贸易有限公司。HRP 标兔抗猪 IgG 购自北京博奥森生物技术有限公司。

1.1.2 酶、试剂

*Ex Taq*TM DNA 聚合酶、T4 DNA 连接酶以及限制性内切酶购自宝生物工程 (大连) 有限公司。M-MLV 逆转录酶购自普洛麦格 (北京) 生物技术有限公司。DNA 纯化试剂盒购自北京百泰克生物技术有限公司。VRfast100 病毒基因组提取试剂盒购自上海飞捷生物公司。Ni-NTA 离子柱亲和层析纯化试剂盒购自德国 QIAGEN 公司。测序由上海生物工程有限公司完成。

1.1.3 引物

根据 GenBank 公布的 BVDV VEDEVA 株 (Accession No. AJ585412), 利用 Primer Premier 软件设计 3 条引物 (表 1)。NS3RT 用于反转录获得 BVDV cDNA 和扩增 NS3 基因。NS3sense 和 NS3antisense 引入限制性酶切位点。

表 1 用于扩增 NS3 基因的引物

Table 1 Oligonucleotides employed to amplify NS3 coding regions

Oligonucleotide	Sequence(5'-3')
NS3sense	CGGGATCCGTGTGCAAAAAAATC
NS3antisense	CCCTCGAGGGCATTCTCAGCAGTAGA
NS3RT	TGCCAGAGCGGAGATGAATAAGC

Underlined sequences correspond to restriction sites (*Bam*H I and *Xho* I) used for cloning into the plasmid.

1.2 方法

1.2.1 病毒基因组 RNA 的提取

取 MDBK 细胞培养的 BVDV 上清, 参照 RNA 提取试剂盒进行。

1.2.2 NS3 基因的 RT-PCR 扩增与表达载体的构建

以提取得到的病毒基因组为模板, NS3RT 为特异性引物反转录获得 cDNA。第一步 PCR 扩增模板采用反转录得到的 cDNA, NS3sense 和 NS3RT 为上下游引物进行扩增, 得到目的片段后进行回收纯化。

第二步 PCR 以回收纯化的片段为模板, NS3sense 和 NS3antisense 为引物, 回收目的片段以标准程序构建表达载体 pET-30a(+)-NS3。

1.2.3 瘟病毒属 NS3 基因差异性分析

将 GenBank 中 20 组瘟病毒属序列的 NS3 基因以正确的开放阅读框翻译为氨基酸后, 应用 MEGA4.1 软件对序列进行 P-distance 分析。

1.2.4 基于 NS3 部分基因的进化树的构建

经过序列对比分析后截取部分区域, 应用 MEGA4.1, 采用临近法 (Neighbor-joining method), 设置 1000 次 bootstrap 检测支持度。

其中 NADL (Accession No. AJ133738) 为 BVDV 1a 型参考序列, Osloss (Accession No. M96687) 为 BVDV 1b 型参考序列, New York' 93 (Accession No. AF502399) 为 BVDV 2 型参考序列。

1.2.5 NS3 蛋白的诱导表达及纯化

将提取的阳性质粒转化表达宿主菌 *E. coli* Rosetta(DE3), 接种 5 mL LB(Kan⁺) 培养基中培养至菌液 OD₆₀₀ 为 1.0 左右, 加入 IPTG 至终浓度 1 mmol/L 诱导表达 2 h, 取诱导表达后的菌液进行表达分析。

大量表达获得重组蛋白包涵体, 将包涵体以 8 mol/L 尿素复溶后加入树脂柱中, 并参照 QIAGEN 蛋白纯化手册进行操作, 纯化的蛋白进一步进行透析复性。

1.2.6 Western blotting 检测

将纯化得到的蛋白经 SDS-PAGE 后转印至 PVDF 膜, 以 5% 的脱脂乳 4℃ 封闭过夜。以 BVDV 阳性血清 (1:2000 稀释) 37℃ 孵育 2 h, HRP 标记兔抗牛 IgG 抗体 (1:10 000 稀释) 37℃ 孵育 1 h, ECL 显色试剂盒进行显色, 胶片曝光, 曝光后的 PVDF 膜以 Stripping Buffer 50℃ 洗膜 15 min, 重新以 5% 的脱脂乳 4℃ 封闭过夜, 以 CSFV 阳性血清 (1:1000 稀释) 37℃ 孵育 2 h, HRP 标记兔抗猪 IgG (1:5000 血清) 37℃ 孵育 1 h, ECL 显色试剂盒进行显色, 胶片曝光。阴性对照为纯化的 pET-32a(+) 空载体蛋白。

1.2.7 间接 ELISA 检测

纯化透析复性后的重组蛋白和 pET-32a(+) 空

载体蛋白经稀释后 (50 μg/mL) 每孔包被 100 μL, 4℃ 过夜, 0.5% PVA+1% 明胶 37℃ 封闭 2 h, 每孔加入 6 份经 Prionics[®] BVDV NS3 Antibody Detection Kit 检测的 BVDV NS3 抗体阳性血清和 4 份 BVDV NS3 抗体阴性血清 (1:2000 稀释), 室温作用 30 min。加入 HRP 标记兔抗牛 IgG 抗体 (1:10 000 稀释), 室温作用 30 min。各步骤之间用 PBST 洗涤 4 次, 每次 5 min。加入 100 μL TMB 底物显色液室温显色 10 min, 1 mol/L 硫酸终止, 酶标仪读取 OD₄₅₀。

2 结果与分析

2.1 pET-30a(+)-NS3 重组质粒的鉴定

重组表达载体 pET-30a(+)-NS3 用 *Bam*H I 和 *Xho* I 进行酶切, 可见双酶切得到约为 5900 bp 和 2000 bp 的两个片段 (图 1), 与预期结果一致。阳性克隆测序并分析后证实基因插入位置、方向、读码框均正确。

2.2 瘟病毒属 NS3 基因差异性分析

氨基酸序列的 P-distance 分析为不同氨基酸数与参比氨基酸的比值, 该分析表明 NS3 蛋白的氨基酸序列在同种但不同株病毒中差异很小, 并且在瘟病毒属病毒中也较为保守, 平均 P-distance 为 0.07, 最大 P-distance 值仅为 0.10 (表 2)。

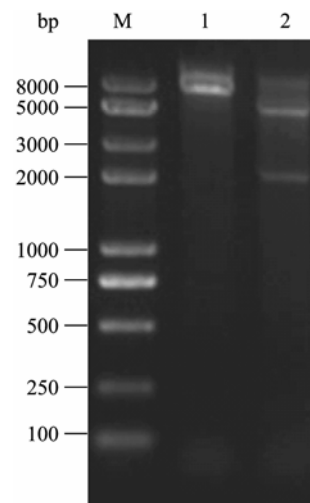


图 1 重组质粒 pET-30a(+)-NS3 的酶切鉴定

Fig. 1 Identification of recombinant plasmid pET-30a(+)-NS3 by enzyme digestion. M: DL2000 plus II marker, 1: pET-30a(+)-NS3 digested with *Bam*H I, 2: pET-30a(+)-NS3 digested with *Bam*H I and *Xho* I.

表 2 NS3 基因差异性分析

Table 2 Estimates of evolutionary divergence pestivirus

Strains	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
1 C24V(AF091605)																				
2 CP7(BVU63479)	0.02																			
3 KE9(EF101530)	0.02	0.01																		
4 KS86-1NCP(AB078950)	0.02	0.02	0.02																	
5 NADL(AJ133738)	0.01	0.02	0.03	0.02																
6 Osloss(M96687)	0.02	0.01	0.01	0.02	0.02															
7 SD1(M96751)	0.01	0.02	0.02	0.02	0.01	0.02														
8 Singer_Arg(DQ088995)	0.01	0.02	0.02	0.02	0.00	0.02	0.01													
9 VEDVEAC(AJ585412)	0.04	0.02	0.03	0.03	0.04	0.02	0.03	0.04												
10 1373(AF145967)	0.09	0.08	0.08	0.08	0.08	0.08	0.08	0.08	0.09											
11 p24515(AY149216)	0.09	0.08	0.08	0.07	0.08	0.08	0.08	0.08	0.09	0.00										
12 New York'93(AF502399)	0.09	0.08	0.08	0.08	0.08	0.08	0.08	0.08	0.09	0.00	0.00									
13 p11Q(AY149215)	0.09	0.08	0.08	0.07	0.08	0.08	0.08	0.08	0.09	0.00	0.00	0.00								
14 DB31(BDU70263)	0.08	0.08	0.08	0.08	0.08	0.08	0.08	0.08	0.09	0.07	0.07	0.07	0.07							
15 X818(AF002227)	0.08	0.08	0.08	0.08	0.08	0.08	0.08	0.08	0.09	0.08	0.07	0.08	0.07	0.01						
16 C413(AF037405)	0.10	0.09	0.10	0.09	0.10	0.10	0.10	0.10	0.11	0.02	0.02	0.02	0.02	0.09	0.09					
17 96TD(AY554397)	0.09	0.09	0.09	0.09	0.10	0.09	0.10	0.10	0.10	0.09	0.08	0.09	0.08	0.06	0.05	0.10				
18 C(AY805221)	0.10	0.10	0.10	0.09	0.11	0.10	0.10	0.10	0.11	0.09	0.09	0.09	0.09	0.06	0.06	0.11	0.02			
19 Alforf(X87939)	0.10	0.09	0.09	0.09	0.10	0.09	0.10	0.10	0.10	0.08	0.08	0.08	0.08	0.06	0.05	0.10	0.01	0.01		
20 Shimen(AY775178)	0.09	0.09	0.09	0.09	0.10	0.09	0.10	0.10	0.10	0.08	0.08	0.08	0.08	0.05	0.05	0.10	0.01	0.01	0.00	

2.3 进化树的构建

NS3 部分基因进化树分析可知, VEDEVAC 株与 Osloss 株亲缘关系较近, 隶属于 BVDV 1 型 (图 2)。

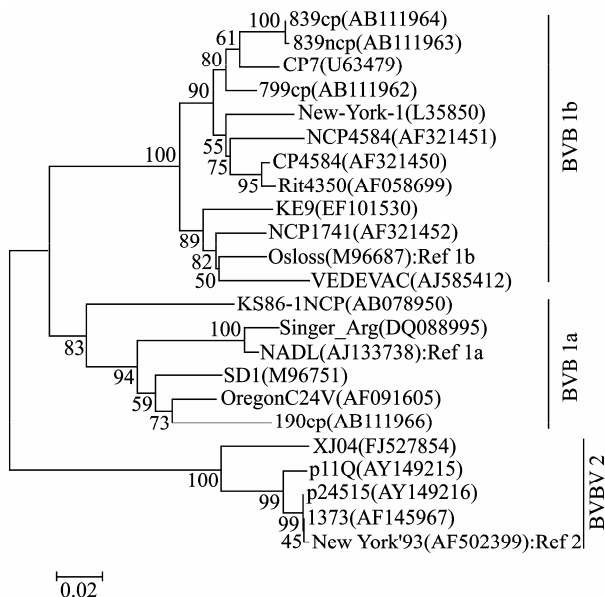


图 2 系统进化树分析

Fig. 2 Phylogenetic analysis. Bootstrap test is shown.

2.4 重组蛋白的表达分析及纯化

将含有重组质粒 pET-30a(+)-NS3 的 *E. coli* Rosetta(DE3) 诱导表达 (1 mmol/L IPTG) 后进行 SDS-PAGE 电泳分析, 显示诱导后的重组菌有一条约为 80 kDa 左右的特异性蛋白条带, 表达形式分析表明该蛋白以包涵体形式表达在细胞质中。提取的包涵体经过 Ni-NTA 柱纯化系统以 pH 值和咪唑浓度梯度洗脱 (图 3)。

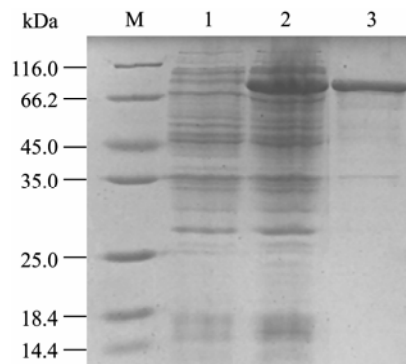


图 3 SDS-PAGE 检测 NS3 重组蛋白的表达

Fig. 3 Identification of recombinant protein by SDS-PAGE. M: protein marker; 1: *E. coli* Rosetta (DE3)/pET-30a(+)-NS3 culture without IPTG induction; 2: *E. coli* Rosetta(DE3)/pET-30a(+)-NS3 culture with IPTG induction; 3: purification of NS3 protein.

2.5 Western blotting 检测

Western blotting 结果显示, 表达的 NS3 重组蛋白可以与 BVDV 阳性血清及 CSFV 阳性血清分别反应 (图 4)。

2.6 间接 ELISA 检测

间接 ELISA 结果显示表达的重组 NS3 蛋白可与 BVDV NS3 抗体阳性血清反应, OD_{450} 均大于 0.8, 所设立的阴性血清组及空载体对照组测得的 OD_{450} 均小于 0.2, 说明牛病毒性腹泻病毒阳性血清可以与所得的重组 NS3 蛋白发生反应 (表 3)。

3 讨论

本研究利用套式 PCR 直接获得带有酶切位点的编码 BVDV VEDEVAC 株 NS3 蛋白的全长基因并将该基因直接克隆至 pET-30a(+) 载体中进行原核表达。序列分析表明, 该蛋白的氨基酸序列在同种但不同株病毒中差异很小, 并且在瘟病毒属病毒中也较为保守, 最大 P-distance 值仅为 0.10。这种极小的

表 3 纯化的重组 NS3 蛋白的间接 ELISA 结果

Table 3 I-ELISA assay using purified recombinant NS3 protein

Result of Prionics® BVDV NS3 antibody detection kit	Value of OD_{450}	
	Recombinant NS3 protein	Negative control
+	0.809	0.186
+	1.129	0.151
+	1.051	0.198
+	1.160	0.119
+	1.149	0.192
+	0.921	0.178
-	0.124	0.131
-	0.114	0.152
-	0.143	0.113
-	0.133	0.171

差异也造成了血清学上的交叉反应, 实验证实表达出的重组蛋白不仅可以与 BVDV 阳性血清反应而且可以与同属的 CSFV 阳性血清反应。

系统进化树分析是研究病毒的遗传进化, 追踪其发生发展规律的一种有效手段^[9], Nagai 等^[10]采用 BVDV 不同基因进行系统进化树分析比较, 结果表明都能够准确反映出 BVDV 进化特征。实验进化树分析采用的 BVDV 部分 NS3 基因区段, bootstrap 值显示具有较高的可信度。

在 BVDV 病毒感染增值过程中, 机体免疫系统的 CD4+ T 细胞可识别 NS3 蛋白, 并诱导机体产生针对 NS3 蛋白的特异性抗体, 且 NS3 抗体持续时间较长, 因此配合结构蛋白抗体检测如 E2 或 E0 蛋白, 同时检测非结构蛋白 NS3 抗体水平可以作为区分灭活疫苗免疫或病毒感染的有效指标之一。

近些年来, 牛病毒性腹泻病毒 NS3 基因的研究一直是牛病毒性腹泻病毒研究的热点, 国内均报道过利用大肠杆菌系统分段表达 NS3 蛋白及利用真核表达系统表达 NS3 蛋白。但本研究通过原核表达系统获得了 BVDV VEDEVAC 株 NS3 全长重组蛋白。与众多的蛋白表达系统相比, 大肠杆菌表达系统成本最为低廉, 尤其适合大量获得重组蛋白, 但有些基因因含有较多的大肠杆菌稀有密码子对或疏水区而造成表达困难, 本实验选择含有编码稀有密码子对 tRNA 的表达宿主菌 *E. coli* Rosetta(DE3) 有利于蛋

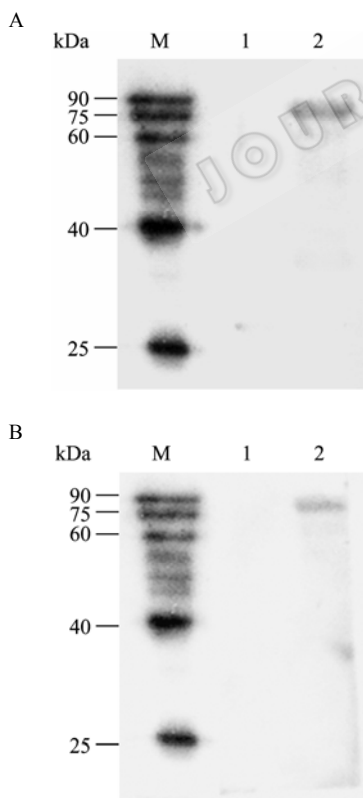


图 4 NS3 重组蛋白的 Western blotting 检测

Fig. 4 Identification of recombinant protein by Western blotting. (A) BVDV positive serum. (B) CSFV positive serum. M: ECL protein marker; 1: negative control; 2: recombinant NS3 protein.

白的表达。但NS3蛋白较大,原核表达系统可能无法折叠出正确构象,蛋白以包涵体形式存在,经透析复性后得到可溶性蛋白,虽然会损失一部分有效蛋白,但包涵体形式存在的蛋白较为稳定,且易于富集,一定程度上降低了纯化的难度。为了提高蛋白和Ni-NTA离子柱的结合能力,表达的重组蛋白在羧基端和氨基端各融合一个6×His标签,也可以防止出现单一融合His标签被蛋白包裹在内部,不易于与Ni-NTA离子柱结合的现象。

ELISA方法由于其检测快速、灵敏、成本低廉而广泛应用于疫病血清学检测。很多商品化的ELISA诊断抗原是通过大肠杆菌表达系统大量获得。本实验ELISA结果显示获得的重组抗原可以与BVDV阳性血清反应,序列分析表明,该区段高度保守,不易出现变异,可以作为检测BVDV NS3抗体ELISA检测方法的包被抗原,因此,可为日后建立针对NS3抗体的ELISA检测方法奠定基础。

REFERENCES

- [1] Lindberg A, Brownlie J, Gunn GJ, *et al.* The control of bovine viral diarrhoea virus in Europe: today and in the future. *Rev Sci Tech*, 2006, **25**(3): 961–979.
- [2] Goyal SM, Ridpath JF. *Bovine Viral Diarrhea Virus: Diagnosis, Management, and Control*. Ames: Wiley-Blackwell, 2005: 272.
- [3] Pestova TV, Hellen CU. Internal initiation of translation of bovine viral diarrhoea virus RNA. *Virology*, 1999, **258**(2): 249–256.
- [4] Ridpath JF, Bolin SR, Dubovi EJ. Segregation of bovine viral diarrhoea virus into genotypes. *Virology*, 1994, **205**(1): 66–74.
- [5] Wiskerchen M, Collett MS. Pestivirus gene expression: protein p80 of bovine viral diarrhoea virus is a proteinase involved in polyprotein processing. *Virology*, 1991, **184**(1): 341–350.
- [6] Tamura JK, Warrener P, Collett MS. RNA-stimulated NTPase activity associated with the p80 protein of the pestivirus bovine viral diarrhoea virus. *Virology*, 1993, **193**(1): 1–10.
- [7] Warrener P, Collett MS. Pestivirus NS3 (p80) protein possesses RNA helicase activity. *J Virol*, 1995, **69**(3): 1720–1726.
- [8] Grassmann CW, Isken O, Behrens SE. Assignment of the multifunctional NS3 protein of bovine viral diarrhoea virus during RNA replication: an *in vivo* and *in vitro* study. *J Virol*, 1999, **73**(11): 9196–9205.
- [9] Flores EF, Ridpath JF, Weiblen R, *et al.* Phylogenetic analysis of Brazilian bovine viral diarrhoea virus type 2 (BVDV-2) isolates: evidence for a subgenotype within BVDV-2. *Virus Res*, 2002, **87**(1): 51–60.
- [10] Nagai M, Hayashi M, Sugita S, *et al.* Phylogenetic analysis of bovine viral diarrhoea viruses using five different genetic regions. *Virus Res*, 2004, **99**(2): 103–113.