

H3N2 SIV 河南株非结构蛋白 1(NS1) 重组的纯化及 Dot-ELISA 的建立^①

赵 朴^{1,2}, 郑玉姝^{1,2}, 贾贝贝^{1,2}, 赵 坤^{1,2},
姚四新^{1,2}, 王三虎^{1,2}, 刘兴友^{1,2}, 刘丽艳^{1,2}

1. 河南科技学院 动物科学学院, 河南 新乡 453003;

2. 动物疫病和残留物防控河南省高校工程技术研究中心, 河南 新乡 453003

摘要: 为建立鉴别猪流感病毒感染猪和灭活疫苗免疫猪的诊断方法, 利用 pET-28a 载体在大肠杆菌 BL21 中表达 H3N2 SIV 河南株 NS1, 并通过 Ni²⁺-NTA 亲和色谱法纯化 His-NS1 融合蛋白. 用 SDS-PAGE, Western blotting 和 Dot-ELISA 分析纯化蛋白, 表明重组 NS1 能与猪流感病毒感染猪血清进行特异性反应, 而不与灭活疫苗免疫猪血清反应. 结果表明重组蛋白能作为区别猪流感病毒感染猪和灭活疫苗免疫猪的诊断抗原, 为控制猪群中的流感病毒奠定了基础.

关键词: 猪流感病毒; 非结构蛋白 1; 纯化; 鉴别诊断

中图分类号: S852.65⁺1

文献标志码: A

猪流感病毒(Swine influenza virus, SIV)不仅是猪呼吸系统综合征的重要病原体, 引起病猪发热、食欲减退、咳嗽、呼吸困难和平均日增体质量降低, 而且极易引起其他病毒和细菌继发感染^[1], 给养猪业造成重大经济损失. 猪呼吸道上皮细胞表面同时存在人流感病毒受体 SA- α -2, 6Gal 和禽流感病毒(avian influenza virus, AIV)受体 SA- α -2, 3Gal, 这样猪既可感染人流感病毒又可感染禽流感病毒, 从而成为人-禽流感病毒重组的理想“混合器”^[2], 不时地从猪群中分离出重组的流感病毒也充分证明了这一点^[3-5]. Ito 等^[2]证实 AIV 连续在猪体内传代, 可导致其产生人流感病毒样特性. 最近 H1N1 猪流感病毒引发的流感情^[6]再次警示人们, 控制猪群中的猪流感病毒, 即是从源头上控制人类流感病毒. 因此, 建立一种可以鉴别诊断猪流感人工免疫与自然感染的方法, 对猪群中的流感病毒进行监测显得尤为重要.

A 型流感病毒非结构蛋白 1(Nonstructural protein 1, NS1)产生于流感病毒感染过程, 而成熟病毒粒子中没有, 所以灭活疫苗免疫动物不会产生针对 NS1 的抗体. Vincent 等^[7]将 H3N2 SIV 毒力基因 NS1 缺失突变后, 病毒毒力大大降低, 鼻内免疫可对 H3N2 SIV(包括抗原变异株)攻毒提供很好的保护作用, 对异型 H1N1 病毒提供部分保护作用, 并且免疫猪呈 NS1 抗体阴性^[8]. 因此, 检测 NS1 抗体, 能够区分流感

① 收稿日期: 2010-03-30

基金项目: 河南科技学院青年基金资助项目(7044).

作者简介: 赵 朴(1975-), 男, 河南南阳人, 讲师, 硕士, 主要从事动物病毒学与免疫学研究.

疫苗免疫猪(灭活疫苗和 NS1 缺失突变弱毒)和流感病毒自然感染猪. 本研究利用大肠杆菌表达 H3N2 SIV 河南分离株 NS1 基因, 获得 NS1, 并通过镍螯合层析柱纯化 NS1, Western blotting 结果表明纯化的 NS1 能够与 SIV 感染猪血清发生特异性反应, 随后将纯化的 NS1 作为包被抗原, 初步建立了 Dot-ELISA, 检测 SIV 感染猪血清中的 NS1 抗体, 结果表明包被 75 ng 重组 NS1 即可检测到 SIV 感染猪血清中的 NS1 抗体, 并且 NS1 不与灭活疫苗免疫猪血清反应, 能够鉴别灭活疫苗免疫猪和流感病毒感染猪.

1 材料和方法

1.1 菌株和质粒

H3N2 SIV 河南株 NS1 表达质粒 pETNS1, 由河南科技学院动物科学学院构建并鉴定.

1.2 主要试剂

HisTrap 镍螯合层析柱购自 Amersham Pharmacia 公司; BCA 总蛋白定量试剂盒购自美国 Pierce 公司; 金黄色葡萄球菌 A 蛋白交联的辣根过氧化物酶(HRP-SPA)购自上海生物制品研究所; 低分子量蛋白 Marker 购自宝生物工程有限公司(大连).

1.3 重组 NS1 的诱导表达

挑取转化表达载体 pET-NS1 的 BL21(DE3)单菌落, 接种于含 30 $\mu\text{g}/\text{mL}$ Kan 的 LB 培养基中, 37 $^{\circ}\text{C}$ 震荡培养至 $A_{600}=0.5\sim 0.6$, 然后按 1:100 的比例加入含有 Kan (30 $\mu\text{g}/\text{mL}$)的 LB 液体培养基中, 37 $^{\circ}\text{C}$ 振荡培养 2 h($A_{600}=0.5\sim 0.6$), 加入 0.1 mol/L IPTG 至体积分数为 1.0 mmol/L, 37 $^{\circ}\text{C}$ 继续震荡培养 4 h, 即得诱导表达 NS1 的大肠杆菌.

1.4 重组 NS1 的纯化

将 1.3 的诱导表达 NS1 的大肠杆菌 100 mL, 在 4 $^{\circ}\text{C}$ 5 000 r/min 条件下离心 10 min, 收集诱导表达菌体, 用 5 mL 50 mmol/L Tris-HCl (pH=8.0)溶液重悬菌体, 加溶菌酶至质量浓度为 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 30 $^{\circ}\text{C}$ 水浴 30 min 裂解细菌, 冰浴超声波(10 s \times 5 次)裂解菌体, 4 $^{\circ}\text{C}$ 12 000 r/min 离心 15 min, 弃上清液, 适量洗涤液重悬沉淀, 2 mL 8 mol/L 尿素变性溶液溶解包涵体, 4 $^{\circ}\text{C}$ 8 h. 将溶解的包涵体于 4 $^{\circ}\text{C}$ 12 000 r/min 条件下离心 15 min, 吸取上清液, 以 1 mL HisTrap 镍螯合层析柱(Amersham)对 NS1 蛋白进行纯化, 具体操作按说明书进行.

1.5 纯化 NS1 的鉴定

利用 SDS-PAGE 和 Western blotting 法鉴定纯化的 NS1, BCA 法测定蛋白质量浓度. 将 1.4 中纯化的 NS1, 按 1:1 加 SDS-PAGE 上样缓冲液煮沸 5 min, 12%SDS-PAGE 检测表达蛋白; 利用半干式电转移, 以 50 mA, 30 min 将 SDS-PAGE 凝胶中的蛋白转移至硝酸纤维素膜, 取出转移膜, 放入 5%的脱脂奶粉, 4 $^{\circ}\text{C}$ 封闭 8 h, PBS 洗涤 3 次, SIV 感染猪血清(1:100 稀释)37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 1 h, 洗涤 3 次, 加入 1:5 000 稀释的辣根过氧化物酶标记的 SPA, 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 1 h, 洗涤 3 次, 置于显色液, 至出现条带, 蒸馏水漂洗终止显色.

1.6 Dot-ELISA 的初步建立

倍比稀释纯化的 NS1, 检测重组 NS1 在 Dot-ELISA 中的有效性. 剪取适当大小硝酸纤维素膜, 以 0.30 mg/mL 为起始质量浓度倍比稀释重组 NS1, 每点加样 2 μL , 室温干燥, 2%BSA 封闭液 37 $^{\circ}\text{C}$ 震荡孵育 1 h, 0.5%Tween 20 的 PBST 震荡漂洗 3 次, 每次 3 min, 浸入 1:100 稀释的 H3N2 SIV 感染猪血清(对照加 H3N2 灭活疫苗免疫猪血清), 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 1 h, 洗涤 3 次, 加入 1:5 000 稀释的辣根过氧化物酶标记的 SPA, 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 1 h, 洗涤 3 次, 置于显色液, 至出现明显斑点后, 蒸馏水漂洗终止显色, 观察结果.

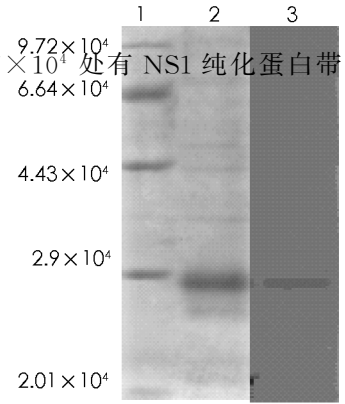
2 结 果

2.1 纯化 NS1 的鉴定

纯化 NS1 经 12% SDS-PAGE 检测, 结果显示在分子质量约为 2.7×10^4 处有 NS1 纯化蛋白带(图 1), 与预期结果一致; 纯化 NS1 经 SDS-PAGE 后电转至硝酸纤维素膜, 与阳性血清和酶标抗体反应, 显色, 在分子质量约为 2.7×10^4 处有特异性显色带, 表明 NS1 纯化后能够与 SIV 感染猪血清发生特异性反应.

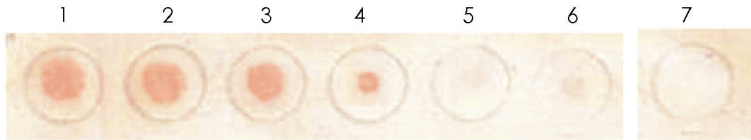
2.2 重组 NS1 在 Dot-ELISA 中的应用

由 Dot-ELISA 显色结果(图 2)可推算, 75 ng 是纯化 NS1 与 H3N2 SIV 感染猪血清反应呈现可见斑点的最小量, 而在对照(图 2 斑点 7)中, 与斑点 1 等量的纯化 NS1 ($0.6 \mu\text{g}$) 与 H3N2 灭活疫苗免疫猪血清反应, 仍没有可见斑点, 表明重组 NS1 能作为 Dot-ELISA 的包被抗原, 鉴别诊断 SIV 感染猪和灭活疫苗免疫猪.



1: 低分子量蛋白 Marker; 2: 纯化 NS1 的 SDS-PAGE; 3: 纯化 NS1 的 Western blotting

图 1 纯化 NS1 的鉴定



1~6: NS1 与 SIV 感染猪血清反应(倍比稀释 NS1, $2 \mu\text{L}/\text{点}$, 起始质量浓度 0.3 mg/mL); 7: NS1 与灭活疫苗免疫猪血清反应

图 2 重组 NS1 在 Dot-ELISA 中的有效性

3 讨 论

SIV 在猪群中广泛存在, 是猪呼吸系统综合征的重要病原体, 感染免疫细胞, 引起继发感染, 不仅给养猪业造成重大的经济损失, 而且还对人类健康造成严重威胁^[9]. 因此, 监测和控制猪群中的流感病毒, 有助于从源头上控制人群中的流感病毒. 最近, H1N1 猪流感病毒引发的流感疫情, 再次表明了这一举措的迫切性和必要性, 而建立能够鉴别诊断人工免疫猪和自然感染猪的检测方法是监测猪群中流感病毒的前提.

非结构蛋白 1(nonstructural protein 1, NS1)在 A 型流感病毒中较为保守^[10], 仅在流感病毒感染过程中产生, 成熟病毒粒子中没有, 所以灭活疫苗免疫动物不会产生针对 NS1 的抗体. 因此, 检测 NS1 抗体是鉴别流感病毒感染与疫苗免疫猪的理想靶标.

H3N2 SIV 是猪群中常见的流感病毒, 本研究利用 PET28 载体表达 H3N2 SIV 河南分离株 NS1 基因, 该载体带有 6 个组氨酸标签, 可方便地利用镍整合层析柱纯化表达 NS1, Western blotting 结果表明纯化的 NS1 能够与 SIV 感染猪血清发生特异性反应, 随后将纯化的重组 NS1 作为包被抗原, 初步建立了 Dot-ELISA 分析, 检测 SIV 感染猪血清中的 NS1 抗体, 结果表明包被 75 ng 重组 NS1 即可检测到 SIV 感染猪血清中的 NS1 抗体, 可诊断 SIV 感染猪群和疫苗免疫猪群, 为监测猪群中的流感病毒奠定基础.

参考文献:

- [1] GUTIERREZ-MARTIN C B, RODRIGUEZ-DELGADO O, ALVAREZ-NISTAL D, et al. Simultaneous Serological Evidence of Actinobacillus Pleuropneumoniae, PRRS, Aujeszky's Disease and Influenza Viruses in Spanish Finishing Pigs [J]. Res Vet Sci, 2000, 68(1): 9-13.
- [2] ITO T, COUCEIRO J, KELM S, et al. Molecular Basis for the Generation in Pigs of Influenza A Virus with Pandemic

- Potential [J]. *J Virol*, 1998, 72(9): 7367-7373.
- [3] BROWN I H, HARRIS P A, MCCAULEY J W, et al. Multiple Genetic Reassortment of Avian and Human Influenza A Viruses in European Pigs, Resulting in the Emergence of a H1N2 Virus of Novel Genotype [J]. *J Gen Virol*, 1998, 79(12): 2947-2955.
- [4] RICHT J A, LAGER K M, JANKE B H, et al. Pathogenic and Antigenic Properties of Phylogenetically Distinct Reassortant H3N2 Swine Influenza Viruses Cocirculating in the United States [J]. *J Clin Microbiol*, 2003, 41(7): 3198-3205.
- [5] MA Wen-jun, GRAMER M, ROSSOW K, et al. Isolation and Genetic Characterization of New Reassortant H3N1 Swine Influenza Virus From Pigs in the Midwestern United States [J]. *J Virol*, 2006, 80(10): 5092-5096.
- [6] NAFFAKH N, VAN DER WERF S. April 2009: An Outbreak of Swine-origin Influenza A(H1N1) Virus with Evidence for Human-to-human Transmission [J]. *Microbes Infect*, 2009, 11(8-9): 725-728.
- [7] VINCENT A L, MA Wen-jun, LAGER K M, et al. Efficacy of Intranasal Administration of a Truncated NS1 Modified Live Influenza Virus Vaccine in Swine [J]. *Vaccine*, 2007, 25(47): 7999-8009.
- [8] RICHT J A, LEKCHAROENSUK P, LAGER K M, et al. Vaccination of Pigs Against Swine Influenza Viruses By Using a NS1-truncated Modified Live-virus Vaccine [J]. *J Virol*, 2006, 80(22): 11009-11018.
- [9] 赵朴, 郑玉姝, 李海燕. 猪流感——一个不容忽视的人兽共患病 [J]. *中国兽医杂志*, 2008, 44(9): 54-56.
- [10] TUMPEY T M, ALVAREZ R, SWAYNE D E. Diagnostic Approach for Differentiating Infected from Vaccinated Poultry on the Basis of Antibodies to NS1, the Nonstructural Protein of Influenza A Virus [J]. *J Clin Microbiol*, 2005, 43(2): 676-683.

Purification of the Recombinant NS1 Protein of H3N2 SIV in He'nan Province and Preliminary Establishment of a Dot-ELISA

ZHAO Pu^{1,2}, ZHENG Yu-shu^{1,2}, JIA Bei-bei^{1,2}, ZHAO Kun^{1,2},
YAO Si-xin^{1,2}, WANG San-hu^{1,2}, LIU Xing-you^{1,2}, LIU Li-yan^{1,2}

1. College of Animal Science and Technology, He'nan Institute of Science and Technology, Xinxiang He'nan 453003, China;

2. Research Center for Animal Diseases Control and Residues Supervision, Xinxiang He'nan 453003, China

Abstract: To develop a diagnostic method of differentiating the infected from the vaccinated animals, NS1 of Swine influenza virus (SIV) isolated in Henan was expressed in BL21(pET-28a), and His-NS1 fusion protein was purified by Ni²⁺-NTA affinity chromatography. The purified NS1 protein was analyzed by SDS-PAGE, Western blotting and dot-ELISA. Results showed that the recombinant NS1 protein can react specifically with sera from pig infected with SIV, but not sera from pig immunized with inactivated vaccine. It is concluded that the recombinant NS1 protein can be used as a diagnostic antigen to differentiate the infected from the vaccinated pigs, providing the basis for control of influenza viruses in pigs.

Key words: swine influenza virus; nonstructural protein 1; purification; differential diagnosis